

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-272465

(P2002-272465A)

(43) 公開日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
// A 6 1 K 35/76		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 29/00		31/16	
31/16		35/00	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-145935(P2001-145935)

(22) 出願日 平成13年5月16日 (2001.5.16)

(31) 優先権主張番号 2 3 2 2 0 5 7

(32) 優先日 平成12年10月27日 (2000.10.27)

(33) 優先権主張国 カナダ (C A)

(31) 優先権主張番号 特願2000-152726(P2000-152726)

(32) 優先日 平成12年5月18日 (2000.5.18)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 595155107

株式会社ディナベック研究所

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

(72) 発明者 徳炭 剛

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株

式会社ディナベック研究所内

(72) 発明者 飯田 章博

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株

式会社ディナベック研究所内

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外来遺伝子導入用パラミクソウイルスベクター

(57) 【要約】

【課題】 外来遺伝子を導入することができる、複製能を有するパラミクソウイルスベクターを提供することを課題とする。

【解決手段】 センダイウイルスゲノムcDNAのウイルス遺伝子の前後に外来遺伝子を挿入して外来遺伝子を持つセンダイウイルスを構築した。これらのセンダイウイルスは複製能を有し、導入細胞において外来遺伝子を発現することが判明した。外来遺伝子の発現量は、ネガティブ鎖RNAの3'に近いほど高く、特にNP遺伝子の前、およびNP遺伝子とP遺伝子の間に外来遺伝子を挿入した場合に高い発現が得られた。逆に、ネガティブ鎖RNAの5'に近いほど発現は低く、特にL遺伝子の後ろ、HN遺伝子とL遺伝子の間、およびF遺伝子とHN遺伝子の間に外来遺伝子を挿入した場合に比較的低い発現が得られた。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外来遺伝子を保持し、かつ複製能を有するパラミクソウイルスベクターであって、該ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAにおいて、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の下流に外来遺伝子が位置しているベクター。

【請求項2】 外来遺伝子を保持し、かつ複製能を有するパラミクソウイルスベクターであって、下記(a)から(f)のいずれかに記載のベクター。

(a) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

(b) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

(c) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

(d) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

(e) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

(f) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子が挿入されているベクター。

【請求項3】 ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目～6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子が、順にNP遺伝子、P遺伝子、M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、およびL遺伝子である、請求項2に記載のベクター。

【請求項4】 請求項1から3のいずれかに記載のパラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNA。

【請求項5】 複製能を有するパラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNAであって、該ネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖において、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の下流に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

【請求項6】 複製能を有するパラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNAであって、下記(a)から(f)の

いずれかに記載のDNA。

(a) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

(b) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

(c) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

(d) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

(e) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

(f) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA。

【請求項7】 ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から1番目～6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子が、順にNP遺伝子、P遺伝子、M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、およびL遺伝子である、請求項6に記載のDNA。

【請求項8】 請求項4から7のいずれかに記載のDNAを転写可能に保持するベクターDNA。

【請求項9】 ポジティブ鎖ゲノムRNAを転写可能に保持する、請求項8に記載のベクターDNA。

【請求項10】 パラミクソウイルスベクターにおける外来遺伝子の発現レベルを制御する方法であって、

(a) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法。

(b) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法。

(c) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードす

る遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法。

(d) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法。

(e) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法。

(f) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子を位置させる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、外来遺伝子を導入することができる、複製能を有するパラミクソウイルスベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】これまでの遺伝子治療の臨床研究のアプローチの多くはレトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどのウイルスベクターが利用されている。これらの遺伝子治療用ベクターは、導入効率および持続発現に制限があり、ベクター自体に細胞毒性及び免疫原性があるなど、医学応用上の大きな問題が存在する (Lamb, R.A. & Kolakofsky, D., Paramyxoviridae: the viruses and their replication, in Fields Virology, 3rd edn, (Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P.P. Howley) pp.1177-1204 (Philadelphia, Lippincott-Raven, (1996)).)。これらの対策として新たなベクターがレンチウイルスやHSVをベースに提案されており、また既存ベクターの改良研究が精力的になされている。しかしながら、これらのベクターはいずれも生活環境において、核内でDNAの形態で存在する。従って、患者の染色体とのランダムな相互作用に関わる安全性への危険は完全に回避することは難しい。

【0003】最近のリバースジェネティクス技術の急速な進歩により、従来開発が遅れていたRNAウイルスをベースにしたベクターの開発が可能となりつつある。組み換えRNAウイルスは高い遺伝子導入効率と発現能力を示し、遺伝子治療用ベクターとしての高いポテンシャルが示唆される (Roberts, A. & Rose, J. K., Virology 247, 1-6 (1998); Rose, J. K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14998-15000 (1996); Palese, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11354-11358 (1996)).)。ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つパラミクソウイルスベクターは、レトロウイルス、DNAウイルス、またはプラス鎖RNAウイルスベクターとは大きく異なる幾つかの特徴を持っている。そのゲノムまたはアンチゲノムは

直接にmRNAとしては機能せず、ウイルスのタンパク質合成やゲノム複製を開始させることはできない。ウイルスのRNAゲノムもアンチゲノムも常にリボ核酸タンパク質 (ribonucleoprotein; RNP) 複合体の形で存在し、プラス鎖RNAウイルスに見られるような、mRNAsが相補的な裸のゲノムRNAにハイブリダイズしてゲノムのRNPへのアセンブリを妨害するといったアンチセンスの問題が殆ど起きない。これらのウイルスは自身のRNAポリメラーゼを持っており、RNP複合体を鋳型にしてウイルスmRNAの転写またはウイルスゲノムの複製を行う。特筆すべきことにネガティブ鎖RNA (nsRNA) ウイルスは宿主細胞の細胞質でのみ増殖し、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み (integration) は起こらない。更にはRNA同士の相同組み換えも認められていない。これらの性質はネガティブ鎖RNAウイルスの遺伝子発現ベクターとしての安定性と安全性に大きく寄与するものと思われる。

【0004】本発明者らはネガティブ鎖RNAウイルスの中でもヒトに対して病原性を持たないセンダイウイルス (Sendai virus; Sev)、中でも特に弱毒であるZ株に注目してきた。Sevは非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスで、パラミクソウイルス (paramyxovirus) に属し、murine parainfluenza virusの一種である。このウイルスは二つのエンベロープ糖タンパク質であるヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (hemagglutinin-neuraminidase; HN) とフュージョンタンパク質 (fusion protein; F) を介して宿主細胞膜に接着、膜融合を起こし、効率的に自分のRNAポリメラーゼとリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体の形で存在するRNAゲノムを細胞質に放出し、そこでウイルスのmRNAの転写及びゲノムの複製を行う

(Bitzer, M. et al., J. Virol. 71(7):5481-5486, 1997)。ウイルスエンベロープ蛋白質Fは活性の無い前駆蛋白 (F₀) として合成され、トリプシンによるタンパク質分解 (proteolytic cleavage) で F1 と F2 に解裂され (Kido, H. et al., Biopolymers (Peptide Science) 51(1):79-86, 1999)、活性型蛋白質となり膜融合を引き起こす。このウイルスはヒトに対して病原性がないと言われている。また、ラボ弱毒株 (Z strain) も分離されており、自然宿主であるげっ歯類に対し軽度の肺炎を誘発する程度である。この株はパラミクソウイルスの転写複製機構等の分子レベルにおける研究モデルとして広く用いられており、またハイブリドーマの作製にも使われてきた。このような高い安全性に加えこのウイルスは、細胞株または鶏卵で $10^9 \sim 10^{11}$ pfu/ml という高い生産タイターを示す。最近成功したネガティブ鎖RNAウイルスベクターのcDNAからの回収システムの中で、センダイウイルスの場合は特に高い再構成効率を示している。外来遺伝子を導入した組み換え型野生ウイルスでは効率的且つ安定的に導入外来遺伝子を発現する能力が注目されている。

【0005】これまでに、外来遺伝子をNP遺伝子の上流

に挿入したセンダイウイルスベクターは知られているが、これ以外の部位に外来遺伝子を挿入した場合に、ウイルスの再構成および外来遺伝子の発現にどのような影響が出るのかについては知られていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、外来遺伝子を導入することができる、複製能を有するパラミクソウイルスベクターを提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、センダイウイルスのウイルス蛋白質をコードする各遺伝子の前後の部位に外来遺伝子を挿入したウイルスベクターDNAを構築し、ウイルスの再構成および外来遺伝子の発現量の検討を行った。すなわち、センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNAに、外来遺伝子挿入用に新たな制限酵素部位をウイルス蛋白質タンパク質をコードする各遺伝子のスタートシグナルとATC翻訳開始シグナルの間に導入した。この制限酵素部位に外来遺伝子 (ヒト分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子) を挿入し、LLC-MK2細胞を用いてセンダイウイルスの再構築を行ったところ、複製能を有するセンダイウイルスが再構築されることが確認された。これらの各ウイルスを鶏卵で増幅し、ウイルスのストック溶液を調製した。このウイルスを、タイターをあわせてLLC-MK2細胞に感染させ、外来遺伝子の発現量を測定したところ、調べたいずれの位置に外来遺伝子を挿入した場合でも、外来遺伝子の発現が見られた。外来遺伝子をゲノムの上流 (ネガティブ鎖の3'側)、すなわちNP遺伝子の前、またはNP遺伝子とP遺伝子との間に挿入した場合では、外来遺伝子の発現量は比較的高く、外来遺伝子の挿入位置がゲノムの下流 (ネガティブ鎖の5'側) に近づくに従って、外来遺伝子の発現が低下することが判明した。

【0008】これらの結果は、外来遺伝子をNP遺伝子の上流またはNP遺伝子の下流 (NP遺伝子とP遺伝子の間) に位置させれば、比較的高い外来遺伝子の発現を得ることが可能であり、外来遺伝子をゲノムのより下流に位置させれば、その発現量を減少させることが可能であることを示している。この知見を基にすれば、外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子をゲノムの上流側、すなわちネガティブ鎖ゲノムの3'側に挿入し、反対に、細胞毒性を有する遺伝子など高発現が好ましくない場合には外来遺伝子をゲノムの下流側、すなわちネガティブ鎖ゲノムの5'側に挿入することによって、ベクターにおける外来遺伝子の発現量を制御することが可能となる。このように本発明のパラミクソウイルスベクターは、外来遺伝子を減弱発現させるためのパラミクソウイルスベクターとして極めて有用である。本発明のパラミクソウイルスベクターは、in vivo および in vitro における外来遺伝子の発現に有用であり、特にパラミクソウイルスの優れた特徴を生かした遺伝子治療用ベクター

としての応用が期待される。

【0009】RNAウイルスではゲノムの安定性の問題が指摘され得るが、SeVベクターによる異種遺伝子発現の結果ではウイルスを連続多代継代しても殆ど塩基の変異が認められず、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている (Yu, D. et al. Genes Cells 2, 457-466 (1997))。このネガティブ鎖RNAウイルスレプリコンをベースにしたベクターは、既に成功しているポジティブ鎖 (positive-strand) RNAウイルスであるセムリキ森林ウイルス (Semliki forest virus) またはシンドビスウイルス (Sindbis viruses) のレプリコンをベースにしたウイルスベクターに比べ、ゲノムの安定性や、カプシド構造タンパク質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上幾つかのメリットがある。複製能を有するセンダイウイルスベクターは、外来DNAを少なくとも4 kbpまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能かもしれない。このセンダイウイルスのレプリコンをベースにしたベクターは複製されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。さらに、本発明者等は、センダイウイルスベクターが血球系の細胞、特に顆粒球系細胞にも高い効率で遺伝子導入され、c-kit陽性のprimitive細胞にも導入されることを見出した。このことから、このベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ応用可能性の高いベクターになり得ることが示唆される。

【0010】即ち本発明は、外来遺伝子を導入することができる、複製能を有するパラミクソウイルスベクターに関し、より具体的には、(1) 外来遺伝子を保持し、かつ複製能を有するパラミクソウイルスベクターであって、該ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAにおいて、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の下流に外来遺伝子が位置しているベクター、(2) 外来遺伝子を保持し、かつ複製能を有するパラミクソウイルスベクターであって、下記(a)から(f)のいずれかに記載のベクター、(a) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、(b) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、(c) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、(d) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'

端から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、

(e) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、

(f) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子が挿入されているベクター、(3) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目~6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子が、順にNP遺伝子、P遺伝子、M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、およびL遺伝子である、(2) に記載のベクター、(4) (1) から

(3) のいずれかに記載のバラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNA、(5) 複製能を有するバラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNAであって、該ネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖において、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子の下流に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、(6) 複製能を有するバラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAまたはその相補鎖をコードするDNAであって、下記(a) から(f) のいずれかに記載のDNA、

(a) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、

(b) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、(c) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、(d) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、(e) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を挿入するためのクローニング部位を保持するDNA、(f) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子を挿入するた

めのクローニング部位を保持するDNA、(7) ネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端に相当する部位から1番目~6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子が、順にNP遺伝子、P遺伝子、M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子、およびL遺伝子である、(6) に記載のDNA、

(8) (4) から(7) のいずれかに記載のDNAを転写可能に保持するベクターDNA、(9) ポジティブ鎖ゲノムRNAを転写可能に保持する、(8) に記載のベクターDNA、(10) バラミクソウイルスベクターにおける外来遺伝子の発現レベルを制御する方法であって、(a) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法、(b) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と3番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法、(c) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から3番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と4番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法、(d) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から4番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と5番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法、(e) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から5番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と6番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に外来遺伝子を位置させる方法、(f) ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子を位置させる方法、に関する。

【0011】なお、本発明において「ウイルスベクター」とは、宿主内に核酸分子を導入する能力を有するウイルス粒子を指す。また、本発明においてバラミクソウイルスとはバラミクソウイルス属(Paramyxovirus)に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なバラミクソウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型(HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウイルス3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウイルス3型(BPIV-3)、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明のウイルスは、より好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子(J. Virology, 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

【0012】パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミ *

パラミクソウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

【0013】例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) 属にも分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

【0014】「複製能を有する」とは、ウイルスペクターが LLC-MK2またはCV-1細胞等の宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

【0015】本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。遺伝子の由来に制限はなく、天然または人為的に設計された配列に由来するものであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、他の蛋白質との融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質 (受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および可溶性細胞表面分子などの形態であり得る。あるいは、感染症に関する細菌またはウイルスの抗原蛋白質の部分ペプチドをコードする遺伝子であってもよい。また、例えばアンチセンス核酸またはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

【0016】

【発明の実施の形態】パラミクソウイルスは、一般に、エンベロープの内部にRNAとタンパク質からなる複合体 (リボヌクレオプロテイン; RNP) を含んでいる。RNPに含まれるRNAはパラミクソウイルスのゲノムであるネガティブ鎖 (マイナス鎖) の一本鎖RNAであり、NPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質がこのRNAに結合して複合体を形成している。このRNPに含まれるRNAがウイルスゲノムの転写および複製のための鋳型となる

(Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, Paramyxovir

* ニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

idae: The viruses and their replication. pp.1177-1204. In Fields Virology, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). RNP複合体は、細胞内で自立的にRNP複合体を複製し、遺伝子 (複合体に含まれるRNA) のコピー数を増やす。これにより、外来遺伝子を持つベクターからの外来遺伝子の高い発現がもたらされる。

【0017】本発明のウイルスペクターは、通常、

(a) パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞 (ヘルパー細胞) で転写させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAはNP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。

【0018】ヘルパー細胞で発現させる、ウイルスゲノムをコードするDNA (ベクターDNA) は、ゲノムのマイナス鎖 (ネガティブ鎖RNA) またはその相補鎖 (ポジティブ鎖RNA) をコードしている。例えば、ネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖をコードするDNAをT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNAポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモーターとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAをヘルパー細胞にトランスフェクトしてもよい。細胞内で転写させる鎖は、ウイルスゲノムのポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよいが、ポジティブ鎖が転写されるようにすることが再構成の効率を上げるためには好ましい。

【0019】センダイウイルス (Sendai virus; SeV) の場合、天然のウイルスのゲノムサイズは約15,000塩基で、ネガティブ鎖においては3'の短いリーダー領域に続き、NP (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、M (マトリックス)、F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL (ラージ) 蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。本発明においては、複製能を有する限り、一部の遺伝子が欠損していてもよく、ウイルスゲノム上におけるこれらの遺伝子の配置は野生型と同じ

でなくてもよい。RNPの形成には M、HN、およびF蛋白質は必要ないため、NP、P、およびLタンパク質の存在下でこのゲノムRNA（ポジティブ鎖またはネガティブ鎖）を転写させることによりRNPが構築され、さらにこのRNPから感染性のウイルス粒子が構築される。ベクターの再構築は、例えばLLC-MK2細胞などで行わせることができる。NP、P、およびLタンパク質の供給は、各遺伝子をコードする発現ベクターを細胞に導入することにより行われ得る。また、各遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれていてもよい。RNPを形成させるために発現させる N、P、P、およびL遺伝子は、ベクターのゲノムにコードされる NP、P、およびL遺伝子と完全に同一である必要はない。すなわち、これらの遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列は、RNPゲノムがコードするタンパク質のアミノ酸配列そのままでもなくとも、ゲノムRNAと共にRNPを形成し、このRNPからの遺伝子発現を誘導する活性を有する限り、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。RNPが形成されれば、このRNPから NP、P、およびL遺伝子が発現され、細胞内で自立的にRNPが複製し、エンベロープタンパク質と共にウイルスベクターが生産される。

【0020】産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。また、ウイルスベクターの再構成で形成されるRNPをLLC-MK2細胞などの宿主細胞に再度導入して培養することにより、本発明のウイルスベクターを増幅することもできる。この過程は、
(a) バラミクスウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNA、並びに NP、P/C、および L 蛋白質からなる複合体を細胞に導入する工程、および (b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収する工程、を含む。

【0021】RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。

【0022】ウイルス再構成の際に、ゲノムRNAがコードするエンベロープタンパク質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させてもよい。このようなタンパク質としては、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を挙げることができる。本発明のバラミクスウイルスベクターは、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むベクターであってもよい。また、

ウイルスのエンベロープタンパク質以外にも、例えば、特定の細胞に接着しうような、接着因子、リガンド、受容体等由来のポリペプチドを細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを用いることが可能である。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上の遺伝子など）の発現により供給されてもよい。

【0023】また、本発明のウイルスベクターは、例えば、SeV蛋白質による免疫原性を低下させるために、または、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リポソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析することが再構成系の確立により可能となったため、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたセンダイウイルスを作製することもできる。

【0024】本発明のウイルスベクターは、ネガティブ鎖一本鎖RNA中に外来遺伝子をコードしているか、または外来遺伝子を挿入するための部位を有する。外来遺伝子としては、標的細胞中で発現させたい所望の遺伝子を用いることが可能である。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の下流に挿入することができる (実施例参照)。ここで「下流」とは、タンパク質をコードするセンス鎖において3'側に隣接する部位をさす。すなわち、ネガティブ鎖RNA (またはDNA) であれば、遺伝子の下流とは該遺伝子の5'側隣接部位であり、ポジティブ鎖RNA (またはDNA) であれば、該遺伝子の3'側隣接部位を言う。

【0025】本発明は、特に外来遺伝子の発現を制限したい場合に有用である。外来遺伝子をネガティブ鎖ゲノムの下流に挿入するほど、外来遺伝子の発現レベルを減弱させることができる。この場合、本発明のベクターとしては、外来遺伝子を保持し、かつ複製能を有するバラ

ミクソウイルスベクターであって、該ベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAにおいて、3'端から2番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子より少なくとも下流に外来遺伝子が位置しているベクターが好ましい。より好ましくは、外来遺伝子は、ネガティブ鎖ゲノムRNAにおいて、3'端から3番目、さらに好ましくは4番目、さらに好ましくは5番目、さらに好ましくは6番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子より少なくとも下流に位置している。また本発明は、これら本発明のパラミクソウイルスベクターにより外来遺伝子の発現レベルを制御する方法に関する。外来遺伝子を、ネガティブ鎖ゲノムの3'側に位置させる程、その発現レベルを相対的に上昇させることができ、逆に5'側に位置させる程、発現レベルを低下させることができる。発現レベルを相対的に低下させたい場合は、例えば、外来遺伝子をパラミクソウイルスベクターに含まれるネガティブ鎖ゲノムRNAの3'端から1番目に位置するウイルスタンパク質をコードする遺伝子と2番目のウイルスタンパク質をコードする遺伝子の間に、より好ましくは同2番目と3番目の間に、さらに好ましくは同3番目と4番目の間に、さらに好ましくは同4番目と5番目の間に、さらに好ましくは同5番目と6番目の間に、さらに好ましくは同6番目とトレイラー配列の間に位置させる。これにより、外来遺伝子の発現を所望のレベルに制御することが可能である。

【0026】例えば野生型パラミクソウイルスにおいては、ウイルス遺伝子は、ネガティブゲノムの3'から順にNP、P、M、F、HN、およびLの順で配置しているが、本発明のベクターにおいてはこれ以外の配置であってもよい。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前および/または後ろに適宜E-I-S配列（転写終結配列-介在配列-転写開始配列）またはその部分を挿入する。例えば、センダイウイルスゲノムをコードするDNAにおいて外来遺伝子を導入する場合には、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子間に6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830）。挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の5'側（先頭）に付加する転写開始配列の種類により調節することができる。また、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。

【0027】実施例に示すように、センダイウイルスにおいては、挿入位置がネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子のうち最も上流（ネガティブ鎖の3'側）の遺伝子の下流（すなわち1番目の遺伝子と2番目の遺伝子の間）に外来遺伝子を挿入する。具体的には、野生型ゲノムの遺伝子配置においてはNP遺

伝子の下流（ネガティブ鎖においてはNP遺伝子の5'隣接部位）、つまりNP遺伝子とP遺伝子の間に外来遺伝子を挿入する。ウイルスタンパク質をコードする遺伝子のうち上流（ネガティブ鎖の3'側）から2番目と3番目の間に外来遺伝子を挿入すると、1番目と2番目の間に挿入した場合よりも減弱した発現が得られる。この場合、野生型ゲノムの遺伝子配置においてはP遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはP遺伝子の5'隣接部位）、つまりP遺伝子とM遺伝子の間に外来遺伝子を挿入することが好ましい。挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が低い。ウイルスタンパク質をコードする遺伝子のうち上流（ネガティブ鎖の3'側）から3番目と4番目の間に外来遺伝子を挿入すると、より減弱した発現が得られ、4番目と5番目の間に外来遺伝子を挿入すると、さらに発現量が低く抑えられる。3番目と4番目の間に外来遺伝子を挿入する場合、野生型ゲノムの遺伝子配置においてはM遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはM遺伝子の5'隣接部位）、つまりM遺伝子とF遺伝子の間に外来遺伝子を挿入することが好ましい。4番目と5番目の間に外来遺伝子を挿入する場合、野生型ゲノムの遺伝子配置においてはF遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはF遺伝子の5'隣接部位）、つまりF遺伝子とHN遺伝子の間に外来遺伝子を挿入することが好ましい。さらに外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子のうち最も下流（ネガティブ鎖の5'側）にあるウイルスタンパク質をコードする遺伝子の上流（すなわち5'側から1番目の遺伝子と2番目の遺伝子の間；野生型ウイルスゲノムにおいては、3'側から5番目の遺伝子と6番目に遺伝子の間）、より低い発現を得るには下流（すなわちネガティブ鎖の5'端から1番目の遺伝子とトレイラー配列の間、野生型ゲノムにおいては3'側から6番目の遺伝子とトレイラー配列の間）に外来遺伝子を挿入する。具体的には、野生型ゲノムの遺伝子配置においてはL遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位）または下流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位）、すなわち、それぞれHN遺伝子とL遺伝子の間またはL遺伝子とトレイラー配列の間に外来遺伝子を挿入する。本発明のベクターは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。

【0028】外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、典型的には制限酵素の認識配列とすることができる。好ましくは、挿入した外来遺伝子中にその部位が存在しそうな制限酵素

部位を設計する。このような制限酵素としては、8bp認識の制限酵素など、長い認識配列を有するものが好ましい。8bp認識の制限酵素としては、例えば Asc I (CG↓CCGCC)、Fse I (GGCCGG↓CC)、Not I (GC↓GGCCG C)、Pac I (TTAAT↓TAA)、Pme I (GTTT↓AAAC)、Sfi I (GCCCNNN↓NGGCC)、Sgf I (CCGAT↓CGC)、Srf I (GCCC↓GGGC)、Sse232 I (CG↓CCGGCG)、Sse8387 I (CCTGCA↓GG)、および Swa I (ATTT↓AAAT) などが挙げられるがこれらに制限されない。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、制限酵素以外のエンドヌクレアーゼにより切断される配列であってもよい。また、クローニングサイトを組換え酵素の認識配列として、組換えにより外来遺伝子を挿入することも考えられる。ウイルスゲノムをコードするDNA中にこれらの配列を設計することは、公知の変異導入法により行い得る。さらに、外来遺伝子挿入部位を予め分断しておきクローニングサイトとすることも考えられる。分断したベクターDNAの5'末端を脱リン酸化しておけば、外来遺伝子が挿入されたクローンを優先的に生じさせることができる。また、分断したベクターDNAの3'末端をTの一塩基突出末端にしておけば、PCRにより増幅した外来遺伝子（末端がAの突出末端になっている）を簡便にクローニングすることも可能である。ベクターDNAがプラスミドのように環状DNAであれば、クローニングサイトを分断しておいても両端が遊離しないため、高いライゲーション効率を得ることができる。

【0029】ウイルスゲノムをコードするDNA（ベクターDNA）への外来遺伝子の挿入は、例えば、Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

【0030】まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/μl以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子をNotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列（E）、介在配列（I）及び転写開始配列（S）（EIS配列）のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列（E）、介在配列（I）及び転写開始配列（S）と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側合成DNA配列及びリバー

ス側合成DNA配列を作成する。

【0031】例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスパーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

【0032】リバー側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのEIS塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール（rule of six）」；Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998）。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCACCT-3'（配列番号：1）、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバー側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

【0033】PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

【0034】ウイルスゲノムをコードするDNAは、適当な転写プロモーターを連結してベクターDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させ、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、バラミクソウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下で本発明のバラミクソウイルス

ベクターのゲノムをコードするDNAを転写させる工程を含む、該ベクターの製造方法を提供する。また本発明は、該DNAからなる、本発明のバラミクソウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のバラミクソウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる(国際公開97/16539号;国際公開97/16538号; Durbin, A.P. et al., 1997, *Virology* 235: 323-332; Whelan, S.P. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8388-8392; Schnell, M.J. et al., 1994, *EMBO J.* 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 5773-5784; Lawson, N.D. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, *EMBO J.* 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, *J. Virol.* 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水痘性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーベストウイルス、センダイウイルスなどを含むバラミクソウイルス科のウイルスベクターをDNAからウイルスを再構成させることができる。

【0035】例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つ、DNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

【0036】②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F.L. and Van Der Eb, J., 1973, *Virology* 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, *Cell* 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35℃、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿液中のDNA濃度が 20~30 μg/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10⁵) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクシ

ョンを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率性はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界(電極間のギャップ、電圧)の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

【0037】以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, CatNo. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられる。

【0038】cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100 μg/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエント(1×10⁶ 細胞)になるまで培養し、例えば 1 μg/ml psoralen (ソラレン) 存在下 UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3 (Fuerst, T.R. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8122-8126, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 μg、より好ましくは 3~5 μg の上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5 μg のpGEM-N、12-0.25 μg のpGEM-P、および24-0.5 μg のpGEM-L、より好ましくは1 μg のpGEM-N、0.5 μg のpGEM-P、および1 μg のpGEM-L) (Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579, 1996) と共に Superfect (QIAGEN社) を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 μg/ml のリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは40 μg/ml のシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma) のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培

養液に添加して感染させ培養する。培養3～7日後に培養液を回収する。あるいは、回収した細胞を別の細胞に重層するなどして共培養してもよい。あるいは、上記の凍結融解による細胞破砕物を10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種し、約3日後、尿液を回収してもよい。培養上清または尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Gene Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)により決定することができる。混入し得るワクシニアウイルスvTF7-3を除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈(例えば 10^6 倍)して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは -80°C で保存することができる。

【0039】回収したパラミクソウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法により行うことができる。「実質的に純粋」とは、単離した物質(化合物、ポリペプチド、またはウイルス等)が、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、試料中に存在する実質的に純粋な成分は、試料中の他の成分を合わせた全体の50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占める。割合は当業者に公知の手順により、例えば重量比率[w/w]等で算出される。当然溶媒、塩、添加化合物などを除いて算出されるべきである。パラミクソウイルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(WO97/32010)等を例示することができる。

【0040】本発明の組換えセンダイウイルスベクターは、例えば生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明の組換えセンダイウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含むこともできる。本発明の組換えセンダイウイルスベクター含有組成物には、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の生理学的に許容しうる担体または媒体を含んでもよい。「生理学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有さ

れていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。

【0041】ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクターの再構成においては、サル腎由来のCV-1細胞やLLC-MK2細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適切なエンベロープタンパク質を発現させることで、そのエンベロープを有する感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている(中西ら編,(1993),「神経科学研究の先端技術プロトコルIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9～12日間 $37\sim 38^{\circ}\text{C}$ で培養し、胚を成長させる。センダイウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代眞人,「ウイルス実験プロトコル」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73,(1995))。

【0042】外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接(ex vivo)投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。本発明のウイルスベクターは安全性が高く、さらに外来遺伝子の発現量を制御することができるため、幅広い臨床応用に対応できると期待される。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。また、外来遺伝子として、感染症に関する細菌またはウイルスの抗原をコードする遺伝子を用いれば、これを動物に投与することにより、該動物において免疫を誘導することができる。即ち、ワクチンとして利用することができる。病原性のパラミクソウイルス、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに本発明を適用することもできる。

【0043】ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対し本発明のウイルスベクターを適用することが考えられる。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提

示細胞 (APC) に本発明のベクターを用いて治療効果を有する遺伝子を発現させることができる。このような遺伝子としては、癌抗原 Muc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド (米国特許第 5,744,144号)、メラノーマ gp100抗原などが挙げられる。このような遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、脾臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2 と一本鎖IL-12 との組み合わせ (Proc. Natl. Acad. Sc 10 i. USA 96 (15): 8591-8596, 1999)、ii) IL-2とインターフェロン- γ (米国特許第 5,798,100号)、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、iv) 脳腫瘍を治療対象としたGM-CSF と IL-4 の組み合わせ (J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)) などが挙げられる。

【0044】感染症の治療としては、インフルエンザにおいては、例えば強毒株 H5N1 型エンベロープ、日本脳炎においては、例えばエンベロープキメラ (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えば HIV gag または SIV gag タンパク質 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIVエンベロープタンパク質の経口投与によるワクチン治療、ポリ乳酸-グリコール共重合体に包んでの投与 (Kaneko, H. et al., Virology 267: 8-16 (2000))、コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット (CTB) (Arakawa, T., et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8. Arakawa, T., et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell, D. L. et al., 1 30 998, Nature Medicine 4(8):949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパク L1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000)) などが挙げられる。

【0045】本発明のベクターをワクチンとして用いる場合には、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を組み合わせることもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全 Freund's アジュバント、MF59 (オイルエマルジョン)、MTP-PE (マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide)、および QS-21 (soapbark tree Quilaja s 40 aponaria 由来) などのアジュバントを組み合わせることもできる。

【0046】また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドの発現が行われている (Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-9 4)。

【0047】ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与形態、および投与方

法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。好ましくは、投与組成物に含有されるベクター量は約 10^5 pfu/ml から約 10^{11} pfu/ml の範囲内であるとよい。より好ましくは、投与組成物に含有されるベクターの量は約 10^7 pfu/ml から約 10^9 pfu/ml の範囲内であるとよい。最も好ましくは、約 1×10^8 pfu/ml から約 5×10^8 pfu/ml の範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。

【0048】なお、治療が完了しウイルスベクターの増殖を抑止する必要がある際には治療中に、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することができる。

【0049】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】センダイウイルスにおける極性効果を利用した遺伝子発現量の制御 I

<SeVゲノムcDNAの構築>センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV(+) (Kato, A. et al., Genesto Cells 1: 569-579, 1996) のcDNAに新たな Not I サイトを各遺伝子のスタート (S) シグナルとATC翻訳開始シグナルの間に導入した。導入方法としてはまず、図1 (A) のようにpSeV(+)をSph I/Sal I で消化した断片 (2645bp)、Cla I で消化した断片 (3246bp)、及びCla I/Eco RI で消化した断片 (5146bp) をそれぞれアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN社製) で回収・精製した。Sph I /Sal I で消化した断片はLITMUS38 (NEW ENGLAND BIOLAB社製)、Cla I で消化した断片とCla I/Eco RI で消化した断片は pBluescriptII KS+ (STRATAGENE社製) にライゲーションし、サブクローニングした。続いてNot I サイトの導入にはQuickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社製) を使った。それぞれの導入に用いたプライマーはNP-F間ではセンス鎖: 5'-ccaccgaccacacccaqcgccgcgcacagccacgcgccttcgg-3' (配列番号: 3)、アンチセンス鎖: 5'-ccgaagccgtggtgtgcgcgcgccttgggtgtggtcgg-3' (配列番号: 4)、P-M間ではセンス鎖: 5'-gaaatttcacctaagcgcgcgcgaatggcagatatctataq-3' (配列番号: 5)、アンチセンス鎖: 5'-ctatagatatcttccattgcgcgcgccttaggtgaaatttc-3' (配列番号: 6)、M-F間ではセンス鎖: 5'-gggataaagtccttcgcgcgcgccttgggtgcaaaactctcccc-3' (配列番号: 7)、アンチセンス鎖: 5'-ggggaagagttttgcaaccaagcgcgcgaaggagctttatccc-3' (配列番号: 8)、F-HN間ではセンス鎖: 5'-ggtgcgcgcgcgccttagcgcgcgcctcaacaagcacagatcatg-3' (配列番号: 9)、アンチセンス鎖: 5'-ccatgatctgtgcttgggttggggcgcgcgcgctaagtcaccgcgcgcgc-3' (配列番号: 10)、HN-L間ではセンス鎖: 5'-cctgccatccatgacctaagc

ggccgccttcccatcaccctggg-3' (配列番号: 11)、アンチセンス鎖: 5'-cccaagggtgaatgggaagcggccgctagggtcatggatgggcagg-3' (配列番号: 12) をそれぞれ合成し、用いた。

【0050】鋳型としてNP-F間はSalI/SphI断片、P-M間、M-F間はClaI断片、F-HN間、HN-L間はClaI/EcoRI断片をそれぞれ上記でサブクローニングしたものを用いてQuickchange Site-Directed Mutagenesis kitのプロトコルに従い、導入を行った。導入したものを再びサブクローニングした酵素で消化して同様に回収・精製し、元のセンダイゲノムcDNAへアセンブリした。その結果、図1(B)のように各遺伝子間に新たにNotIを導入した5種類(pSeV(+)-NPP、pSeV(+)-PM、pSeV(+)-MF、pSeV(+)-FHNおよびpSeV(+)-HNL)のセンダイウイルスゲノムcDNAを構築した。外来遺伝子を挿入するには、外来遺伝子の下流に終結シグナル-介在配列-開始シグナル(E-I-S)が付加されたDNA断片を上記ゲノムcDNAのNotIサイトに挿入する。このためには、例えば、マルチクローニングサイトと終結シグナル-介在配列-開始シグナルが2つのNotIサイトに挟まれた配列(図2参照)を予め用意しておき、外来遺伝子をマルチクローニングサイトに挿入するのが簡便である。

【0051】遺伝子の下流に外来遺伝子を挿入するに
は、例えば pSev(+)もしくは上記の所望のSev cDNA (pSev-
taagaaaaacttagggtagaaagtcatcgccgc

鎖: 5'-gcggccgcgatgaactttcaccctaagtgttttcttactacgga
tttaaatggcgcgcgcgtttaaacgcggcgc-3' (配列番号: 1
6)]を組み込んだものを作製した(図2)。このプラ
ズミドのAsc Iサイトに精製・回収したPCR産物をライゲ
ーションし、クローニングした。これをNot Iで消化し
てSEAP遺伝子断片を電気泳動で回収・精製し、上記の5
種類のセンダイウイルスゲノムcDNAとpSeV18+のNot Iサ
イトにそれぞれライゲーションし組み込んだ。それぞれの
ウイルスベクターをpSeV(+)/NPP/SEAP、pSeV(+)/PM/SEA
P、pSeV(+)/MF/SEAP、pSeV(+)/FHN/SEAP、pSeV(+)/HNL/SEA
PおよびpSeV18(+)/SEAPとした。

【0053】＜ウイルスの再構築＞LLC-MK2細胞を 2×10^6 cells/dish で100mmシャーレに蒔き、24時間後培養後、ソラレンとUV処理したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) に室温でmoi=2で1時間感染させた。細胞を洗浄してからSEAPを組み込んだ各センダイウイルスcDNA, pGEM/NP, pGEM/P, およびpGEM/Lをそれぞれ12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 及び4 μ g/dishの量比でOptiMEM (GIBCO BRL社製) に懸濁し、110 μ l のSuperFecttransfection reagent (QIAGEN社製) を入れて混合し、室温で15分放置後、最終的に3% FBSを含むOptiMEM 3mlを加え、細胞に添加して3~5時間培養した。培養後、細胞を血清を含ま

* eV18⁺, pSeV(+)-NPP, pSeV(+)-PM, pSeV(+)-MF, pSeV(+)-FH
NおよびpSeV(+)-HNL) 等においてL遺伝子の終止コドンと
転写終結シグナルとの間に存在する制限酵素 Kpn I サ
イトに遺伝子を挿入することができる(図3(A))。そ
の場合、挿入する外来遺伝子には、両端側に KpnI サ
イト、5'側に終結シグナル-介在配列-開始シグナルをPCR
等で付加させる(図3(B))。付加させたDNAをSeV cDNA
へ組み込み、L遺伝子の下流に外来遺伝子が挿入された
cDNAを得る。

10 【0052】遺伝子発現量を見るためのレポータ遺伝子としてヒト分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）をPCRでサブクローニングした。プライマーにはAsc I制限酵素サイトを付加した5'プライマー：5'-gcggcgccctgctgtctgtctgtctgtctgtctgtcggcctt-3'（配列番号：13）、3'プライマー：5'-gcggcgccgcccttatcatgtctgtctgaagcgccgccc-3'（配列番号：14）を合成し、PCRを行った。鋳型にはpSEAP-Basic（CLONTECH社製）、酵素にはPfu turbo DNAポリメラーゼ（STRATAGENE社製）を用いた。PCR後、産物をAsc Iで消化し、電気泳動により精製・回収した。サブクローニングするプラスミドとしてpBluescriptII KS+のNot Iサイトにマルチクローニングサイト（Pme I-Asc I-Swa I）と終結シグナル-介在配列-開始シグナルを含む二本鎖DNA〔センス鎖：5'-gcggcgccgtttaaacggcgccatttaaatccgtaggccac-3'（配列番号：15）、アンチセンス

ないMEMで2回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド (AraC) を含むMEMで72時間培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを1mlのPBSで懸濁し、凍結融解を3回繰り返した。これらを10日間孵卵させた鶏卵に100μl 30 接種し、35°Cで3日間孵卵させたのち、尿液を回収した。ワクシニアウイルスフリーにするため、これら回収した尿液をさらに10⁻⁵ ~ 10⁻⁷ に希釈して鶏卵に再接種し、同様に回収し、分注して-80°Cにストックした。それぞれのウイルスベクター名をSeVNP/SEAP、SeVPM/SEAP、SeVMF/SEAP、SeVFHN/SEAP、SeVHNL/SEAPおよびSeV18/SEAPとする。

【0054】<ブランクアッセイによるタイターの測定>
CV-1細胞を6wellプレートに1wellあたり 5×10^5 cell
sずつ蒔き、24時間培養した。PBS洗浄後、BSA/PBS (1%
BSA in PBS) で 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 に希釈し
た組換えSevを1時間インキュベーションした後、PBSで
洗浄、BSA/MEM/アガロース (0.2% BSA+2×MEMと等量の2
%アガロースを混合したもの) をwellあたり3mlずつ重層
し、6日間37°C、5% CO₂ で培養した。培養後、3mlのエ
タノール/酢酸 (エタノール: 酢酸=1:5) を加え、3時間
放置し、アガロースとともに除去した。PBSで三回洗浄
後、100倍希釈したウサギ抗センダイウイルス抗体で室
温で1時間インキュベーションした。PBSで三回洗浄後、
200倍希釈したAlexa Fluor™ 標識ヤギ抗ウサギIgG(H+I)
(Molecular Probe社) を加えて室温で1時間インキュベ

ーションした。PBSで三回洗浄後、ルミノイメージアナライザーLAS1000（富士フィルム）で蛍光画像を取り込み、ブランクを測定した。結果を図4に示す。またこれから得られたタイターの結果を表1に示す。

【0055】

【表1】 ブランクアッセイの結果から測定した各組換えセンダイウイルスのタイターの結果

組み換えウイルス	タイター (pfu/ml)
SeV18/SEAP	3.9X10 ⁹
SeVNPP/SEAP	4.7X10 ⁸
SeVPM/SEAP	3.8X10 ⁹
SeVMF/SEAP	1.5X10 ¹⁰
SeVFHN/SEAP	7.0X10 ⁹
SeVHNL/SEAP	7.1X10 ⁹

【0056】＜レポーター遺伝子発現の比較＞LLC-MK2細胞を6wellプレートに1wellあたり1~5×10⁵ cellsずつ蒔き、24時間培養した後、各ウイルスベクターをmoi=2で感染させ、24時間後培養上清を100μl回収し、SEAPアッセイを行った。アッセイはReporter Assay Kit-SEAP-（東洋紡）で行い、ルミノイメージアナライザーLAS1000（富士フィルム）で測定した。測定値はSeV18+/SEAPの値を100としてそれぞれ相対値として表した。その結果、図5に示したいずれの位置にSEAP遺伝子を挿入した場合でもSEAP活性が検出された。SEAP活性はゲノムの下流に位置するに従って下がり、すなわち発現量が下がっていることがわかった。SEAP遺伝子の発現量は、挿入位置がゲノムの上流（NP側）から下流（L側）に行くに従い単調減少した。例えば、NP遺伝子とP遺伝子の間にSEAP遺伝子を挿入した場合には、NP遺伝子の上流にSEAP遺伝子を挿入したベクターと、P遺伝子とM遺伝子の間にSEAP遺伝子を挿入したベクターの中間の発現量が検出された。

【0057】＜マルチクローニングサイトの作製＞マルチクローニングサイトをSeVベクターに付加させた。方法は以下の二種類。

1) センダイウイルス（SeV）全長ゲノムcDNA、pSeV18^b(+)（Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820）（「pSeV18^b(+)」は「pSeV18^a」ともいう）cDNAのゲノム中のいくつかの制限酵素サイトを壊し、つぶした制限酵素サイトを含む新たな制限酵素サイトを各遺伝子のスタートシグナルとATC翻訳開始シグナルの間に導入した（図6）。

2) すでに構築したSeVベクターcDNAにマルチクローニングサイト配列と転写開始シグナル-介在配列-終結シグナルを付加させてNotIサイトへ組み込む（図7）。

【0058】1) の場合、導入方法としてはまず、図6(A)のように pSeV18^a をEag Iで消化した断片（2644bp）、Cla Iで消化した断片（3246bp）、Cla I/Eco RIで消化した断片（5146bp）、及びEco RIで消化した断片（5010bp）をそれぞれアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System（QIAGEN社製）で回収・精製した。Eag Iで消化した断片はLITMUS38（NEW ENGLANDBIOLABS社製）、Cla Iで消化した断片、Cla I/Eco RIで消化した断片、及びEco RIで消化した断片はpBluescriptII KS+（STRATAGENE社製）にライゲーションし、サブクローニングした。続いて制限酵素サイトの破壊、導入にはQuickchange Site-Directed Mutagenesis kit（STRATAGENE社製）を使った。

【0059】制限酵素サイトの破壊にはSal I:（センス鎖）5'-ggagaagtctcaacaccgtccacccaagataatcgatcag-3'（配列番号：17）、（アンチセンス鎖）5'-ctgacgcatatcttgggtgacggtgttgagacttctcc-3'（配列番号：18）、Nhe I:（センス鎖）5'-gtatatgtgttcagttgagcttgcgtgcgtctaaaggc-3'（配列番号：19）、（アンチセンス鎖）5'-gccttagaccgacagcaagctcaactgaacacatatac-3'（配列番号：20）、Xho I:（センス鎖）5'-caatgaactcttagagagggctggagtcactaaagattacctgg-3'（配列番号：21）、（アンチセンス鎖）5'-ccaggttaactctttagtgactccaagcctcttagagaggttcattg-3'（配列番号：22）、また制限酵素導入にはNP-F間:（センス鎖）5'-gtgaaagttcatccaccgacgcggtcactcgagggcacaccaacccaccg-3'（配列番号：23）、（アンチセンス鎖）5'-cggtggggttggtgtggcctcgagtgagccgacggtggatgaactttcac-3'（配列番号：24）、P-M間:（センス鎖）5'-cttaggggtgaaagaaatttcagctagcacggcgcaatggcagatgc-3'（配列番号：25）、（アンチセンス鎖）5'-gatattcgccattgcgcgtgctagctgaaattttttcaccctaag-3'（配列番号：26）、M-F間:（センス鎖）5'-cttaggggataaagtccttggtcgcgctgtggtgcaaaactctcccc-3'（配列番号：27）、（アンチセンス鎖）5'-ggggaagattttgcaaccaagcgccacagggactttatccctaag-3'（配列番号：28）、F-HN間:（センス鎖）5'-ggtcgccggttactttagtcgacacctcaacaagcacagatcatgg-3'（配列番号：29）、（アンチセンス鎖）5'-ccatgatctgtgcttgtttgaggtgtcgaactaaagtaccgcgcgacc-3'（配列番号：30）、HN-L間:（センス鎖）5'-cccagggatgaatgggaaggccgcccaggtcatggtggcaggaagtc-3'（配列番号：31）、（アンチセンス鎖）5'-ggactctgcccattcatgacgtggccgccccttccattcaccctggg-3'（配列番号：32）をそれぞれ合成し反応に用いた。導入後、それぞれの断片を上記同様に回収・精製し、cDNAをアセンブリした（図6(B)）。

【0060】2) の場合、（センス鎖）5'-ggccgcttaattaacggttttaaacgcgcgccaacagtggtgataagaaaaacttgggtgaaagttcatcac-3'（配列番号：33）、（アンチセンス

鎖) 5'-ggccgtgatgaactttccaccctaagtttttcttatcaacactgttggcgcgcgttttaaccgttaattaagc-3' (配列番号: 34) を合成し、それぞれの合成DNAをリン酸化し、85°C 2分、65°C 15分、37°C 15分、室温 15分でアニーリングさせ、SeV cDNAへ組み込む。あるいはpUC18またはpBlue scriptII等のマルチクローニングサイトを終結シグナル-介在配列-開始シグナル含むプライマーでPCRしてサブクローニングし、これをSeV cDNAへ組み込む。得られたcDNAでのウイルス再構成は上記の通り行う。

【0061】[実施例2] センダイウイルスにおける極性効果を利用した遺伝子発現量の制御 II <SeVゲノムcDNAの構築とウイルスの回収>センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV(+)のcDNAにNot I サイトをL遺伝子の翻訳終止コドンと転写終結シグナルの間に導入した。導入方法としてはまず、図8のように、pSeV(+)をEco RIで消化した断片 (5010bp) をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAGEN Gel Extraction System (QIAGEN社製) で回収・精製した。回収した断片はpBluescriptII SK+ (STRATAGENE社製) にライゲーションし、サブクローニングした。続いて制限酵素 Not I サイトの導入にはQuickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社製) を使った。プライマーはセンス側: 5'-cgtgcagacgacgaaagctccgcgcgcgtggaagctcttggaacttggtcc-3' (配列番号: 35)、アンチセンス側: 5'-ggacaagtcgaagacttccagcgcgcgcgcgcgcgttcgacgttctgcacg-3' (配列番号: 36) をそれぞれ合成し反応に用いた。導入後、Xho I-Mlu I で消化した断片 (2010bp) を上記同様に回収・精製し、cDNAをアセンブリした (図8)。

【0062】遺伝子発現量を見るための遺伝子としてヒトVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)をPCRでサブクローニングした。プライマーには制限酵素Asc I サイトを付加した5'プライマー: 5'-gcggcgcgcgccaaccatgaactttctgctgtcttggtgacattgg-3' (配列番号: 37)、3'プライマー: 5'-gcggcgcgcgcctcaccgcctcggttgcacatctgcaagt-3' (配列番号: 38) を合成し、PCRを行った。酵素にはKOD - plus- DNAポリメラーゼ (TOYOBO社製) を用いた。PCR後、産物をAsc Iで消化し、電気泳動により精製・回収した。これにセンダイウイルスの転写終結シグナル-介在配列-転写開始シグナルを付加させるためのプラスミドを構築した (図9)。pSeV18+のMlu I - Sph I断片 (3317bp) を組み込んだLITMUS38 (pAC114とする) に終結シグナル-介在配列-開始シグナルとクローニングサイト (Asc I - Pme I) 含む合成二本鎖DNA (センス鎖: 5'-ggccgctaagaaaaacttagggtgaaagtctcactt*

* cacgagggcgcgcgcgttttaactgc-3' (配列番号: 39)、アンチセンス鎖: 5'-ggccgcagtttaaacgcccgcgcctcgtgaagtgaactttcaccctaagtttttcttaagc-3' (配列番号: 40) を組み込んだものであるpAC180を作製した (図9)。このプラスミドのAsc Iサイトに、精製・回収したVEGF PCR産物をライゲーションし、クローニングした。これをNot Iで消化してVEGF遺伝子断片を電気泳動で回収・精製し、センダイウイルスゲノムcDNAのNot Iサイトにライゲーションし組み込んだ。ウイルスベクターcDNAをpSeV+L/VEGFとした。また実施例1記載の方法で作成した終結シグナル-介在配列-開始シグナル (図2参照) を、VEGF cDNAの下流につなぎ、pSeV18+、pSeV(+)/HNLを組み込んだもの (それぞれをpSeV18+/VEGF、pSeV(+)/HNL/VEGFとする) も発現量の比較のため構築した。それぞれのcDNAからウイルスを従来の方法通り回収し、それぞれSeV18+/VEGF、SeVHNL/VEGF、SeV1/VEGFとした。

【0063】<発現量の比較> LLC-MK2細胞を6wellプレートに1wellあたり 5×10^5 cellsずつ蒔き、24時間培養した後、各ウイルスベクターをmoi=5で感染させ、24時間後培養上清を200 μ l回収し、ELISAにより培養上清中のVEGFの定量を行った。その結果を図10に示す。これによりL遺伝子の下流に組み込むことでVEGFの発現量がN遺伝子の下流に組み込んだときより1/10ほど低下することがわかった。本発明者らは、転写開始シグナルを変更することで発現量を変化させることができることを開示 (WO01/18223) しており、これを組み合わせることによりさらに発現量の制御の幅が広がることが予想される。

【0064】

【発明の効果】本発明により、外来遺伝子を導入することができる、複製能を有するパラミクソウイルスベクターが提供された。本発明のベクターは、外来遺伝子の挿入位置を調節することにより、発現レベルを制御することが可能である。特に、外来遺伝子をネガティブ鎖ゲノムに挿入することにより、外来遺伝子の発現レベルを低く抑えることができる。また、2種類以上の部位に外来遺伝子が挿入されたウイルスベクターの作製も考えられる。特にセンダイウイルスベクターは遺伝子導入効率も広範な細胞種に対して極めて高く、さらに本発明により外来遺伝子の発現レベルを制御することができるため、遺伝子治療などの生体における遺伝子導入への利用が期待される。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research INC.

<120> Paramyxovirus vectors used for transduction of foreign genes

<130> D3-X0002Y1

<140>

<141>

<150> JP 2000-152726

<151> 2000-05-18

<150> CA 2322057

<151> 2000-10-27

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 1

ctttcacct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 2

ttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 3

ccaccgacca caccgacgg ccgcgacgc cacggcttcg g

41

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 4

ccgaagccgt ggctatcgcg gccgctgggt gtggtcgtg g

41

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

31

32

synthesized sequence

<400> 5

gaaatttcac ctaagcggcc gcaatggcag atatctatag

40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 6

ctatagatat ctgccattgc ggccgcttag gtgaaatttc

40

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 7

gggataaagt cccttgcggc cgcttggttg caaaactctc ccc

43

<210> 8

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 8

ggggagagtt ttgcaaccaa gcggccgcaa gggactttat ccc

43

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 9

ggcgcgcgg tacttttagcg gccgcctcaa acaagcacag atcatgg

47

<210> 10

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 10

ccatgatctg tgcttggttg aggcggccgc taaagtaccg cgcgacc

47

<210> 11

33 34

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 11

cctgcccatc catgacctag cggccgcttc ccattcaccc tggg 44

<210> 12

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 12

cccagggtga atgggaagcg gccgctaggt catggatggg cagg 44

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 13

gcggcgcgcc atgctgctgc tgctgctgct gctgggctg 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 14

gcggcgcgcc cttatcatgt ctgctcgaag cggccggccg 40

<210> 15

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 15

gcggcgcgct ttaaacggcg cgccatttaa atccgtagta agaaaaactt agggtagaaq 60

ttcatcgcgq ccgc 74

<210> 16

<211> 74

<212> DNA

35

36

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 16

gcggccgcga tgaactttca ccctaagttt ttcttactac ggatttaaatt ggcgcgccgt 60
ttaaaccgcgc ccgc 74

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 17

ggagaagtct caacaccgtc caccgaagat aatcgatcag 40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 18

ctgacgcatt atcttgaggc gacggtgttg agacttctcc 40

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 19

gtatatgtgt tcagttgagc ttgctgtcgg tctaaggc 38

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 20

gccttagacc gacagcaagc tcaactgaac acatatac 38

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

37
synthesized sequence

<400> 21
caatgaactc tctagaagag ctgagtcac taaagagtta cctgg 45
<210> 22
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 22
ccaggaactc ctttagtgac tccagcctct ctagaagatt cattg 45
<210> 23
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 23
gtgaaagttc atccaccgat cggctcactc gaggccacac ccaacccac cg 52
<210> 24
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 24
cggtagggtt gggtaggccc tcgagtgagc cgatcggtag atgaactttc ac 52
<210> 25
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 25
cttagggtga aagaaatttc agctagcacg gcgcaatggc agatatc 47
<210> 26
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 26
gatatctgcc attgcgcgt gctagctgaa atttctttca ccctaag 47
<210> 27

39
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <400> 27
 cttaggata aagtccttg tgcgccttg gttgaaaac tctccc 47
 <210> 28
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <400> 28
 gggagagatt ttgaaccaa gcgcacaa gggacttat ccctaag 47
 <210> 29
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <400> 29
 ggtcgcgcg tactttatgc gacacctcaa acaagcacag atcatgg 47
 <210> 30
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <400> 30
 ccatgatctg tgcctgttg aggtgtcgc taaagtaccg cgcgacc 47
 <210> 31
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence
 <400> 31
 cccaggtga atgggaagg ccggccaggt catggtggg caggagtcc 49
 <210> 32
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

41
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 32
 ggactcctgc ccatccatga cctggccggc cttccatt caccctggg 49
 <210> 33
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 33
 ggccgcttaa ttaacggtt aaacgcgc caacagtgtt gataagaaa acttaggtg 60
 aaagtcatc ac 72
 <210> 34
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 34
 ggccgtgatg aacttcacc ctaagtttt cttatcaaca ctgtggcg gcgtttaa 60
 cgttaattaa gc 72
 <210> 35
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 35
 cgtgcagaac gatcgaagc ccgcggccg tggaagtctt ggacttgcc 50
 <210> 36
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 36
 ggacaagtcc aagacttcca gcggccgag agcttcgatc gttctgcacg 50
 <210> 37
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially

43
synthesized sequence
<400> 37
gcggcgccgccc aaccatgaac tttctgctgt cttgggtgca ttgg
<210> 38
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence
<400> 38
gcggcgccgccc tcaccgcctc ggcttgctac atctgcaagt
<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence
<400> 39
ggccgcctaag aaaaacttag ggtgaaagt cacttcacga ggccgcgccg tttaaactgc 60
<210> 40
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence
<400> 40
ggccgcagtt taaacggcgc gccctcgtga agtgaacttt caccctaagt ttttcttagc 60

【図面の簡単な説明】

【図1】センダイウイルスゲノムcDNA断片のサブクローニング(A)と新たにNotIサイトを導入し構築した5種類のセンダイウイルスゲノムcDNAの構造(B)を示す図である。

【図2】SEAPにNotIサイト、転写開始シグナル、介在配列、転写終結シグナルを付加するためのクローニング用プラスミドの構造を示す図である。

【図3】L遺伝子の下流のセンダイウイルスゲノムの構造(A)、およびL遺伝子の下流へ外来遺伝子を挿入するためのクローニング用DNAの構造(B)を示す図である。

【図4】各センダイウイルスベクターのブランクアッセイの結果を示す図である。LAS1000で取り込んだブランクアッセイの蛍光画像の一部を示す。

【図5】各センダイウイルスベクター間におけるレポーター遺伝子(SEAP)の発現量の違いを比較した結果を示す図である。SeV18+/SEAPのデータを100としてそれぞれ相対値を表した。SEAP遺伝子が下流に位置するに従って

その活性すなわち発現量が低下していくことがわかった。

【図6】センダイウイルスゲノムcDNAに構築したマルチクローニングサイトの構造を示す図である。

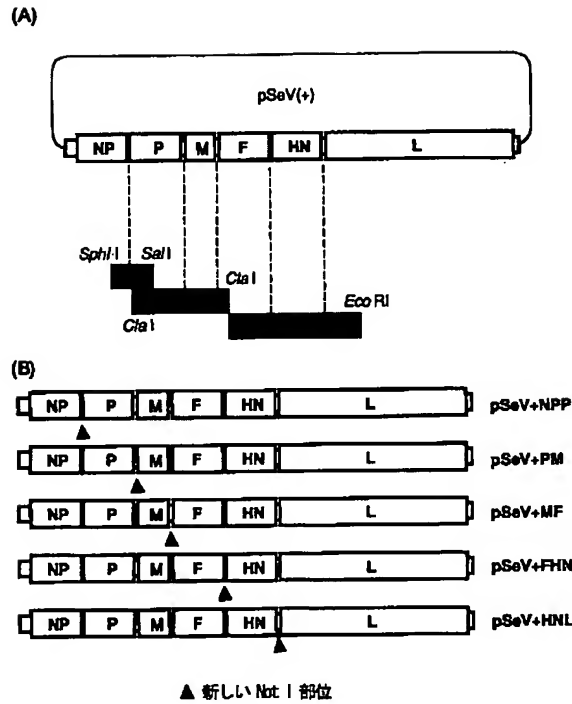
【図7】マルチクローニングサイトの構造を示す図である。塩基配列は、PacI-PmeI-BssHII-TspRIの制限酵素サイトとE/I/S配列を有するマルチクローニングサイトの例を示す。

【図8】センダイウイルスゲノムcDNA断片のサブクローニングと新たにNotIサイトを導入し構築したセンダイウイルスゲノムcDNAの構造を示す図である。

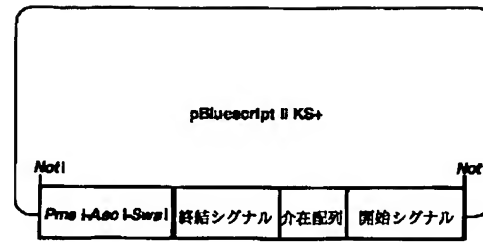
【図9】VEGFにNotIサイト、転写開始シグナル、介在配列、転写終結シグナルを付加するためのクローニング用プラスミドの構造および付加後のVEGFの構造を示す図である。

【図10】ELISAによるVEGF搭載のSeVベクターの発現量の比較を示す図である。L遺伝子の後にVEGFを搭載したものが最も発現量が低かった。

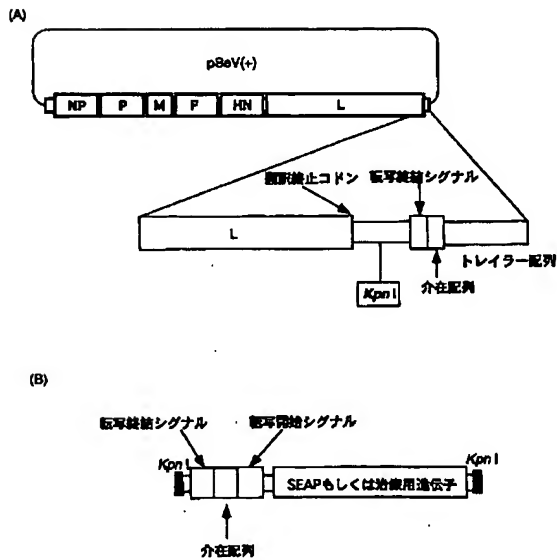
【図1】



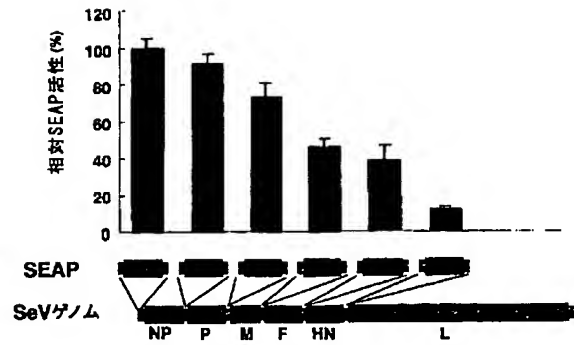
【図2】



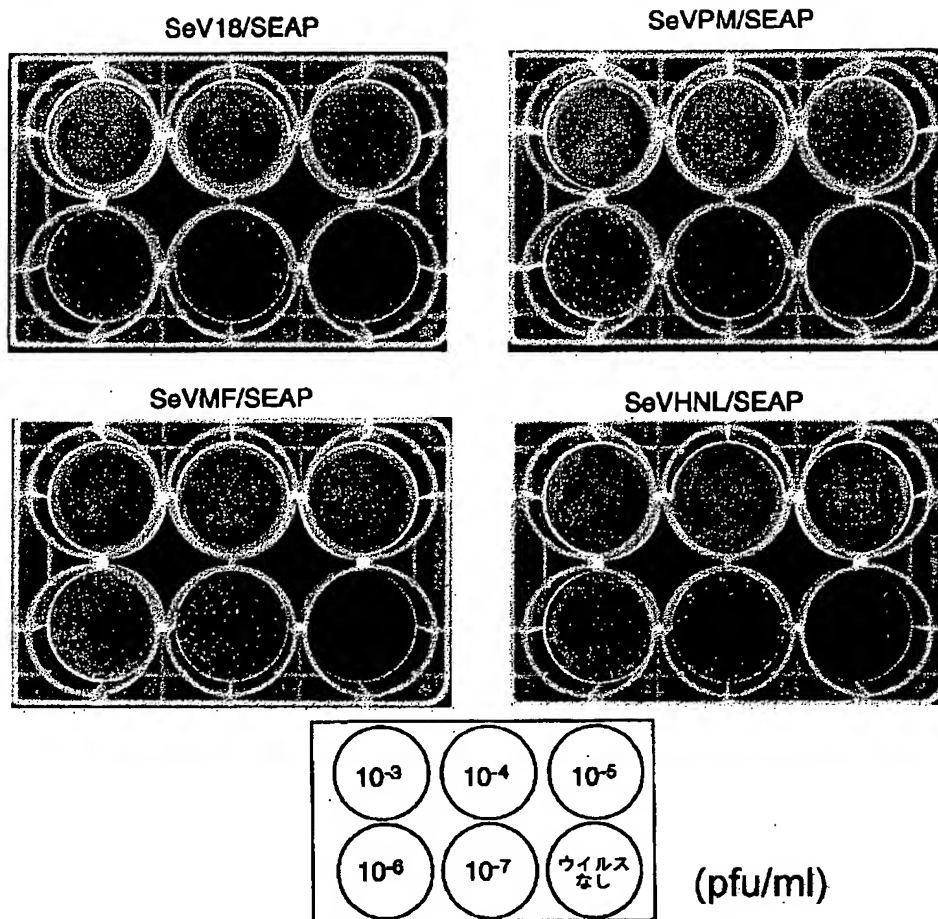
【図3】



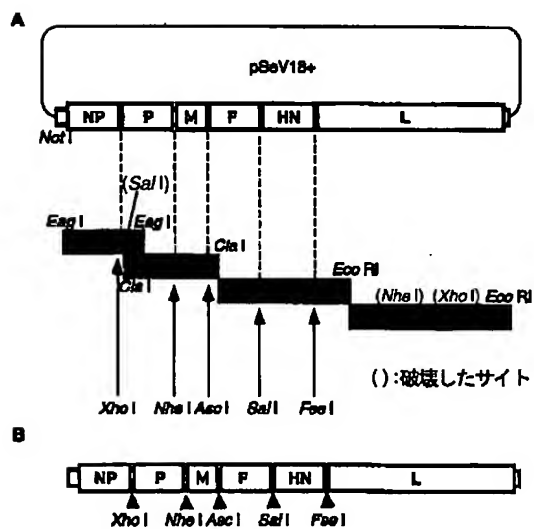
【図5】



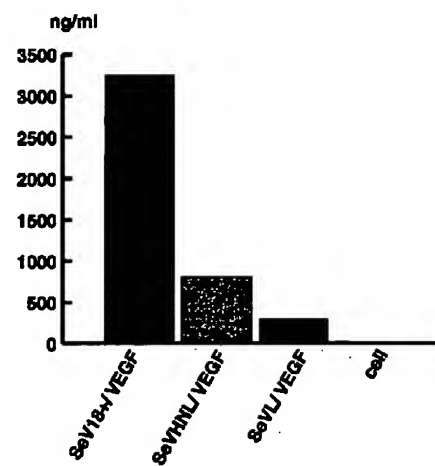
【図4】



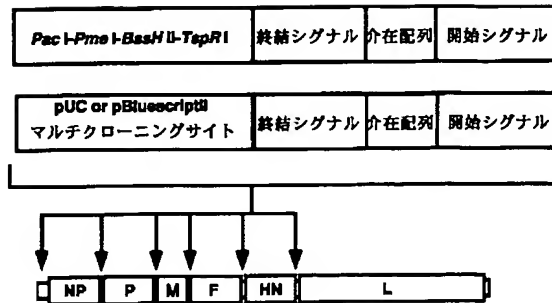
【図6】



【図10】



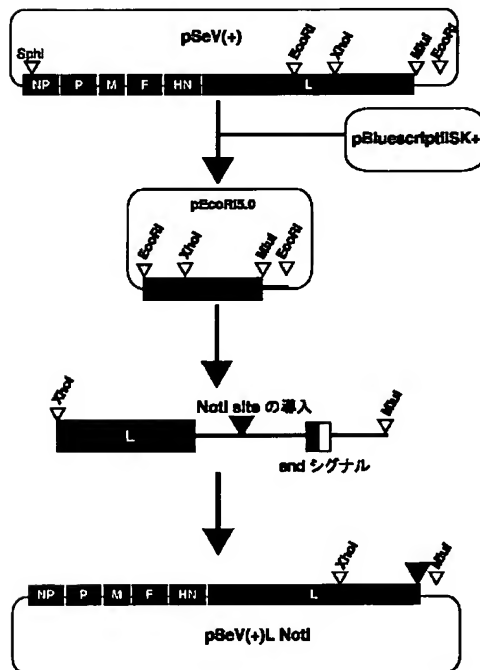
【図7】



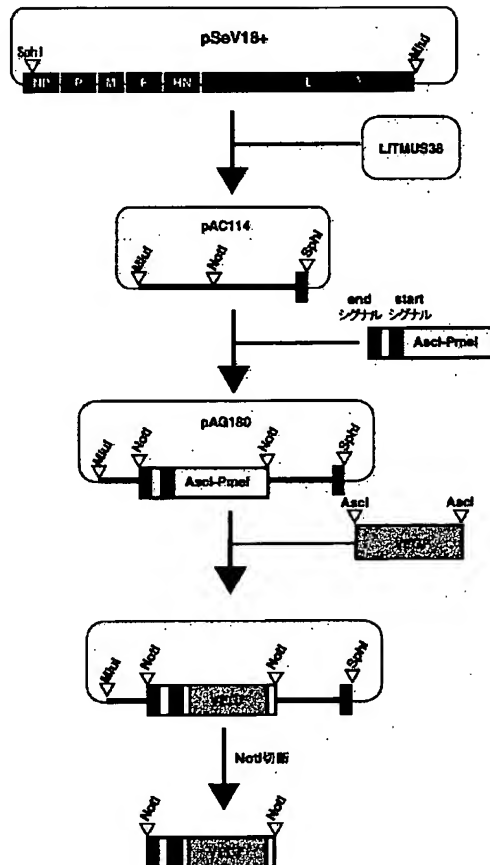
マルチクローニングサイトの例示

5'-GGC CGC TTA ATT AAC GGT TTA AAC GCG CGC CAA CAG TGT TGA TAA GAA AAA CTT AGG GTG AAA GTT CAT CAC
 CG AAT TAA TTG CCA AAT TTG GCG GCG GTT GTC ACA ACT ATT CTT TTT GAA TCC CAC TTT CAA GZA GTG CCGG
 NotI PacI PmeI BssHII TspRI E/I/S

【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(72)発明者 長谷川 護
茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株
式会社ディナベック研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA08 BA21 BA80
CA04 CA11 CA20 DA03 EA02
FA20 GA11 GA18 HA17 HA20
4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB312
ZB332
4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 MA02
NA05 NA13 NA14 ZB21 ZB26
ZB31 ZB33

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-272465

(43)Date of publication of application : 24.09.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09

// A61K 35/76

A61K 48/00

A61P 29/00

A61P 31/16

A61P 35/00

(21)Application number : 2001-145935 (71)Applicant : DNAVEC RESEARCH INC

(22)Date of filing : 16.05.2001 (72)Inventor : TOKUSUMI TAKESHI
IIDA AKIHIRO
HASEGAWA MAMORU

(30)Priority

Priority number : 2000152726 Priority date : 18.05.2000 Priority country : JP
2000 2322057 27.10.2000 CA

(54) PARAMYXOVIRUS VECTOR FOR FOREIGN GENE TRANSDUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a paramyxovirus vector capable of transducing a foreign gene, having a replication ability.

SOLUTION: A Sendai virus having a foreign gene is constructed by inserting the foreign gene into before or behind a virus gene of Sendai virus genome cDNA. The Sendai virus proves that it has a replication ability and a foreign gene is expressed in a transduced cell. The expression amount of the foreign gene is higher closer to 3' of negative chain RNA and a high expression is obtained when the foreign gene is inserted into especially before an NP gene and between the NP gene and a P gene. On the contrary, the expression is lower closer to 5' of the negative chain RNA and a relatively low expression is obtained when the foreign gene is inserted into especially behind an L gene, between a HN gene and the L gene and between an F gene and the NH gene.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The vector to which the foreign gene is located in the lower stream of a river of the gene which carries out the code of the virus protein in the negative chain genome RNA which is the paramyxovirus vector which holds a foreign gene and has duplicate ability, and is contained in this vector.

[Claim 2] the paramyxovirus vector which holds a foreign gene and has duplicate ability -- it is -- the following -- a vector given in either of (a) to the (f).

(a) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein.

(b) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 2nd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein.

(c) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 3rd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 4th virus protein.

(d) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein.

(e) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein.

(f) The gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the vector by which the foreign gene is inserted between trailer arrays.

[Claim 3] The vector according to claim 2 whose genes which carry out the code of the virus protein located in the 1st - 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector are NP gene, P gene, M gene, F gene, HN gene, and an L gene in

order.

[Claim 4] DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in a paramyxovirus vector given in either of claims 1-3, or its complementary strand.

[Claim 5] DNA which is DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in the paramyxovirus vector which has duplicate ability, or its complementary strand, and holds the cloning part for inserting a foreign gene in the lower stream of a river of the gene which carries out the code of the virus protein in this negative chain genome RNA or its complementary strand.

[Claim 6] DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in the paramyxovirus vector which has duplicate ability, or its complementary strand -- it is -- the following -- DNA given in either of (a) to the (f).

(a) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein.

(b) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 2nd from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein.

(c) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 3rd from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 4th virus protein.

(d) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein.

(e) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein.

(f) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and a trailer array.

[Claim 7] DNA according to claim 6 whose genes which carry out the code of the virus protein located in the 1st - 6th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA are NP gene, P gene, M gene, F gene, HN gene, and an L gene in order.

[Claim 8] The vector DNA held possible [an imprint of DNA of a publication] to either of claims 4-7.

[Claim 9] The vector DNA according to claim 8 held possible [an imprint of the positive chain genome RNA].

[Claim 10] How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA which is the approach of controlling the manifestation level of the foreign gene in a paramyxovirus vector, and is contained in the (a) vector, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein.

(b) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the

virus protein located in the 2nd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein.

(c) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 3rd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 4th virus protein.

(d) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein.

(e) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein.

(f) The gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the method of locating a foreign gene between trailer arrays.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the paramyxovirus vector which can introduce a foreign gene and which has duplicate ability.

[0002]

[Description of the Prior Art] As for many of approaches of clinical research of old gene therapy, virus vectors, such as a retrovirus, adenovirus, and an adeno-associated virus, are used. These vectors for gene therapies have a limit in introductory effectiveness and a self-sustaining manifestation. Cytotoxicity and immunogenicity are in the vector itself. The big problem on medicine application exists (it Lamb(s)). R. A. & Kolakofsky and D., Paramyxoviridae: the viruses and their replication. in Fields Virology and 3rd edn (), [Edited by B.N. Fields,] [D.M. Knipe & P.P.] Howley pp. 1177-1204 (Philadelphia and Lippincott-Raven. (1996)). A vector new as these cures is proposed based on the lentivirus or HSV, and amelioration research of the existing vector is made energetically. However, these vectors all exist with the gestalt of DNA within a nucleus in a life cycle. Therefore, avoiding completely is difficult for the anxiety to the safety in connection with a random interaction with a patient's chromosome.

[0003] Development of the vector which used as the base the RNA virus which was conventionally behind in development by rapid advance of the latest reverse genetics technique is being attained. A recombination RNA virus shows high transgenics effectiveness and manifestation capacity. As a vector for gene therapies ** -- high POTENSHARITI is suggested (it Roberts(es)) A. & Rose, J.K., and Virology 247 1-6; (1998) Rose, J.K. and Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 and 14998-15000; (1996) Palese, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11354-11358 (1996). The paramyxovirus vector which has the negative chain RNA in a genome has some greatly different descriptions from a retrovirus, a DNA virus, or a plus strand RNA virus vector. The genome or an anti genome cannot function as mRNA, and cannot make the protein synthesis or the genome duplicate of a virus start directly. The antisense problem of the RNA genome of a virus and an anti genome always existing in the form of ribonucleic-acid protein (ribonucleoprotein; RNP) complex, and mRNAs which is looked at by the plus strand RNA virus hybridizing to the genome RNA of complementary nakedness, and blocking the assembly to RNP of a genome hardly occurs. These viruses have own RNA polymerase, use RNP complex as mold and perform imprint of viral mRNA, or reproduction of a viral

genome. A negative chain RNA (nsRNA) virus is increased only with the cytoplasm of a host cell to what should be mentioned especially, and since it does not have a DNA phase, inclusion (integration) for a chromosome does not take place. Furthermore, the homologous recombination of RNA is not accepted, either. It is thought that these properties contribute to the stability and the safety as a gene expression vector of a negative chain RNA virus greatly.

[0004] this invention persons have observed the Sendai Virus (Sendai virus; SeV) which does not have virulence to the inside of a negative chain RNA virus, or Homo sapiens, and Z shares which are attenuated also especially in inside. SeV is a non-articulating mold negative chain. It is an RNA virus, and it belongs to paramyxovirus (paramyxovirus) and is a kind of murine parainfluenza virus. This virus is pasted up on a host cell membrane through the hemagglutinin-neuraminidase (hemagglutinin-neuraminidase; HN) and fusion protein (fusion protein; F) which are two envelope glycoproteins. Emit membrane fusion to a lifting and the RNA genome which exists in its RNA polymerase and the form of RIBONUKU LEO protein (RNP) complex efficiently is emitted to cytoplasm. Then, imprint of mRNA of a virus and reproduction of a genome are performed (Bitzer, M.et al., J.Virol.71(7):5481-5486, 1997). The viral-envelope protein F is the proteolysis (proteolytic cleavage) are compounded as precursive protein (F0) without activity, and according to a trypsin. F1 F2 It **** (Kido, H.et al., Biopolymers (Peptide Science) 51(1):79-86, 1999), and becomes active protein, and membrane fusion is caused. It is said that this virus does not have virulence to Homo sapiens. Moreover, the lab attenuated stock (Z strain) is also separated and it is extent which induces slight pneumonia to the rodent which is a natural host. This stock is widely used as a research model in molecular levels, such as an imprint duplicator style of paramyxovirus, and has been used also for production of a hybridoma. In addition to such high safety, this virus shows the high production titer of $10^9 - 10^{11}$ pfu/ml by the cell strain or the hen's egg. In the case of Sendai Virus, in the recovery system from cDNA of the negative chain RNA virus vector which was successful recently, high reconstruction effectiveness is shown especially. The capacity which introduced the foreign gene and which rearranges and discovers an introductory foreign gene efficiently [in a mold wildness virus] and stably attracts attention.

[0005] Until now, although known, the Sendai Virus vector which inserted the foreign gene in the upstream of NP gene was not known about what kind of effect appearing in reconstruction of a virus, and the manifestation of a foreign gene, when a foreign gene was inserted in parts other than this.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention makes it a technical problem to offer the paramyxovirus vector which can introduce a foreign gene and which has duplicate ability.

[0007]

[Means for Solving the Problem] this invention persons built the virus vector DNA which inserted the foreign gene in the part before and behind each gene which carries out the code of the virus protein of Sendai Virus, and examined reconstruction of a virus, and the amount of manifestations of a foreign gene. That is, virus protein protein was introduced between the start signal of each gene which carries out the code of the new restriction enzyme part to the Sendai Virus (SeV) overall-length genome cDNA for foreign gene

insertion, and the ATG translation start signal. When the foreign gene (Homo sapiens secretor alkaline phosphatase gene) was inserted in this restriction enzyme part and Sendai Virus was reconstructed using LLC-MK2 cell, it was checked that the Sendai Virus which has duplicate ability is reconstructed. Each of these viruses were amplified by the hen's egg, and the stock solution of a virus was prepared. Even when the titer was united, this virus was infected with LLC-MK2 cell, the amount of manifestations of a foreign gene was measured and a foreign gene was inserted in which investigated location, the manifestation of a foreign gene was seen. In the case where a foreign gene is inserted between the upstream of a genome (3' side of a negative chain), i.e., before NP gene, and NP gene and P gene, it became clear that the manifestation of a foreign gene fell as the amount of manifestations of a foreign gene was comparatively high and the insertion point of a foreign gene approached the lower stream of a river (5' side of a negative chain) of a genome.

[0008] It is shown that these results can obtain the manifestation of a comparatively high foreign gene if a foreign gene is located in the upstream of NP gene or the lower stream of a river (between NP gene and P genes) of NP gene, and it is possible to decrease the amount of manifestations if a foreign gene is located down-stream from that of a genome. case high manifestations, such as a gene which inserts a foreign gene in an upstream [of a genome], i.e., 3' of negative chain genome, side, and has cytotoxicity on the contrary in order to obtain the high manifestation of a foreign gene, if it carries out based on this knowledge, are not desirable -- a foreign gene -- 5' of the downstream of a genome, i.e., a negative chain genome, -- it becomes possible by inserting in a side to control the amount of manifestations of the foreign gene in a vector. Thus, the paramyxovirus vector of this invention is very useful as a paramyxovirus vector for carrying out the decrease manifestation of the foreign gene. The paramyxovirus vector of this invention is in vivo. It reaches. in vitro It is useful to the manifestation of the foreign gene which can be set, and the application as a vector for gene therapies which employed efficiently the description which was excellent in especially paramyxovirus is expected.

[0009] Although the problem of the stability of a genome may be pointed out in an RNA virus, in the result of the heterologous gene manifestation by the SeV vector, even if it carries out the ***** cost passage of the virus, the variation of a base is hardly accepted, but discovering an insertion heterologous gene to stability over a long period of time is shown (Yu, D. et al. Genes Cells 2, and 457-466 (1997)). The vector which used this negative chain RNA virus replicon as the base has merits of property top some, such as the stability of a genome, and size of the introductory gene by not having capsid structural protein or the flexibility (flexibility) of packaging, compared with the virus vector which used as the base replicon of the Semliki forest virus (Semliki forest virus) which is a positive chain (positive-strand) RNA virus which was already successful, or a Sindbis virus (Sindbis viruses). The Sendai Virus vector which has duplicate ability can discover two or more kinds of genes to coincidence by being able to introduce outpatient department DNA to 4kbp(s) at least, and adding an imprint unit. The virus by which the vector which used replicon of this Sendai Virus as the base was reproduced carries out reinfection also to a surrounding cell, and since RNP reproduced by many copies with the cytoplasm of an infected cell is distributed also to a daughter cell with fission of a cell, a self-sustaining manifestation is expected. Furthermore, transgenics of the Sendai Virus

vector was carried out also to the cell, especially granulocytic-series cell of a corpuscle system at high effectiveness, and this invention person etc. found out being introduced also into the primitive cell of a c-kit positivity. From this, it is suggested that this vector can turn into a high vector of application possibility with very large organization applicability.

[0010] This invention relates to the paramyxovirus vector which can introduce a foreign gene and which has duplicate ability. Namely, more specifically (1) In the negative chain genome RNA which is the paramyxovirus vector which holds a foreign gene and has duplicate ability, and is contained in this vector The vector to which the foreign gene is located in the lower stream of a river of the gene which carries out the code of the virus protein, (2) It is the paramyxovirus vector which holds a foreign gene and has duplicate ability. A vector given in either of following (a) to the (f), (a) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein, (b) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 2nd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein, (c) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 3rd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 4th virus protein, (d) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein, (e) The vector by which the foreign gene is inserted between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein, (f) The gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the vector by which the foreign gene is inserted between trailer arrays, (3) the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st – 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector They are NP gene, P gene, M gene, F gene, HN gene, and L gene in order. DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in a vector given in (2), and a paramyxovirus vector given in either of (4) and (1) to (3), or its complementary strand, (5) Are DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in the paramyxovirus vector which has duplicate ability, or its complementary strand, and it sets to this negative chain genome RNA or its complementary strand. DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene in the lower stream of a river of the gene which carries out the code of the virus protein, (6) It is DNA which carries out the code of the negative chain genome RNA contained in the paramyxovirus vector which has duplicate ability, or its complementary strand. DNA given in either of following (a) to the (f), (a) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein, (b) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein

located in the 2nd from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein, (c) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 3rd from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 4th virus protein, (d) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein, (e) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein, (f) DNA holding the cloning part for inserting a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA, and a trailer array, (7) the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st – 6th from the part equivalent to 3' edge of the negative chain genome RNA They are NP gene, P gene, M gene, F gene, HN gene, and L gene in order. The vector DNA held possible [an imprint of DNA given in (6), and DNA given in either of (8) and (4) to (7)] (9) The vector DNA given in (8) held possible [an imprint of the positive chain genome RNA] (10) It is the approach of controlling the manifestation level of the foreign gene in a paramyxovirus vector. (a) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein, (b) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 2nd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 3rd virus protein, (c) It is code ** about the virus protein located in the 3rd from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector. How to locate a foreign gene between the genes which carry out the code of the 4th virus protein to *****, (d) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 4th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 5th virus protein, (e) How to locate a foreign gene between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 5th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the gene which carries out the code of the 6th virus protein, (f) It is related with the gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a vector, and the method of locating a foreign gene between trailer arrays.

[0011] In addition, in this invention, a "virus vector" points out the virion which has the capacity which introduces a nucleic-acid molecule in a host. Moreover, in this invention, paramyxovirus points out the virus belonging to the Paramyxovirus (Paramyxovirus), or its derivative. As paramyxovirus which can apply this invention, Homo sapiens parainfluenza virus 1 mold (HPIV-1), Homo sapiens parainfluenza 3 virus (HPIV-3), cow parainfluenza 3 virus (BPIV-3), Sendai Virus (Sendai virus; called mouse parainfluenza virus 1 mold), and ape parainfluenza-viruses 10 mold (SPIV-10) etc. is contained, for example. The virus of this invention is Sendai Virus more preferably. These viruses may

be a natural stock, a wild strain, a variant, a lab passage stock, the stock built artificially. It can be used as incomplete viruses, such as a defective interfering particle (J.Virol.68, 8413-8417 (1994)), and an ingredient for the compound oligonucleotide etc. to manufacture the virus vector of this invention.

[0012] As a gene which carries out the code of the virus protein of paramyxovirus, NP, P, M, F, HN, and L gene are contained. "NP, P, M, F, HN, and L gene" point out the thing of the gene which carries out the code of nucleocapsid, a phospho ** matrix, a fusion, hemagglutinin-neuraminidase, and the large protein, respectively. Generally each gene in each virus belonging to paramyxovirus subfamily is written as follows. Generally, "N gene" may be written. [NP gene]

Paramyxovirus NP P/C/V M F HN - L RUBURA virus group NP P/V M F HN (SH) L Mho kinky thread virus group NP P/C/V M F H - L [0013] For example, the accession number of the database of the base sequence of each gene of Sendai Virus classified also into the RESUPIRO virus (Respirovirus) group of Paramyxoviridae (Paramyxoviridae) NP gene M29343 and M30202, M30203, M30204, and M51331, M55565, M69046, X17218, and P gene M30202, M30203 and M30204, and M — 55565, M69046, X00583, X17007, X17008, and M gene D11446, K02742, and M30202, M30203, M30204, and M69046, U31956, X00584, X53056, and F gene D00152, D11446, D17334, D17335, M30202 and M30203, M30204, M69046, and X00152, X02131 and HN gene D26475, About M12397, M30202, M30203 and M30204, M69046, X00586, X02808, X56131, and L gene, D00053, M30202, M30203, and M30204, Refer to M69040, X00587, and X58886.

[0014] The virus vector "which has duplicate ability" When infected with host cells, such as LLC-MK2 or valve flow coefficient-1 cell, a virus is reproduced in this cell and it points out that infectivity virion is produced. Moreover, in this invention, a single stranded DNA and double stranded DNA are included with "DNA."

[0015] In this invention, a "gene" points out a genetic material, and nucleic acids, such as RNA and DNA, are contained. There is no limit in the origin of a gene and it may originate in the array designed nature or artificially. As artificial protein, it may be the gestalt of the cell adhesion molecule of a fusion protein with other protein, dominant negative protein (the meltable nature child of an acceptor or a film joint mold dominant negative acceptor is included), and a deletion mold, a meltable mold cell table region child, etc., for example. Or you may be the gene which carries out the code of the bacteria about an infectious disease, or the partial peptide of the antigenic proteins of a virus. Moreover, you may be the nucleic acid which does not carry out the code of the protein, such as antisense nucleic acid or a ribozyme, for example.

[0016]

[Embodiment of the Invention] Generally paramyxovirus contains the complex (RIBONUKU LEO protein; RNP) which becomes the interior of an envelope from RNA and protein. RNA contained in RNP is the single stranded RNA of the negative chain (minus strand) which is the genome of paramyxovirus, and NP protein, P protein, and L protein combine with this RNA, and it forms complex. RNA contained in this RNP serves as mold for the imprint of a viral genome, and a duplicate (). [Lamb, R.A., and D.Kolakofsky, 1996,] [Paramyxoviridae:The viruses] and their replication. pp.1177-1204.In Fields Virology, 3rd edn.Fields, and B.N. and D.M.Knipe and and P.M.Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N.Y. RNP complex reproduces RNP complex independently by intracellular, and increases the copy number of a gene (RNA contained in complex). Thereby, the high

manifestation of the foreign gene with a foreign gene from a vector is brought about.

[0017] The virus vector of this invention can make the vector DNA which usually carries out the code of the negative chain single stranded RNA originating in (a) paramyxovirus, or its complementary strand (positive chain) able to imprint in NP, P, and the cell (helper cell) that discovers L protein, can cultivate (b) this cell, and can prepare it by collecting virions from the culture supernatant. RNA imprinted from Vector DNA NP, L, and P protein and RNP complex are formed, and the virion wrapped in the outer shell which contains envelope protein further forms.

[0018] DNA (vector DNA) which is made to discover by the helper cell and which carries out the code of the viral genome is carrying out the code of the minus strand (negative chain RNA) of a genome, or its complementary strand (positive chain RNA). For example, DNA which carries out the code of negative chain single stranded RNA or its complementary strand is made to connect with T7 promotor's lower stream of a river, and it is T7 RNA. RNA is made to imprint by polymerase. As a promoter, a desired promoter can be used besides the thing containing the recognition sequence of T7 polymerase. Or a helper cell may be transfected in RNA made to imprint by in vitro one. Although the positive chain or negative chain of a viral genome is sufficient as the chain made to imprint by intracellular, in order for that a positive chain is imprinted to gather the effectiveness of reconstruction, it is desirable.

[0019] In the case of Sendai Virus (Sendai virus; SeV), the genome sizes of a natural virus are about 15,000 bases, and are set to a negative chain. NP (nucleocapsid), P (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase), and six genes that carry out the code of the L (large) protein are located in a line following the short reader field of 3', and it has short 5' trailer field in the other end. In this invention, as long as it has duplicate ability, some genes may be missing and arrangement of these genes on a viral genome may not be the same as a wild type. In formation of RNP Since M, HN, and F protein are unnecessary, by making this genome RNA (a positive chain or negative chain) imprint under NP, P, and existence of L protein, RNP is built and the virion of infectivity is further built from this RNP. Reconstruction of a vector can be made to perform for example, in LLC-MK2 cell etc. Supply of NP, P, and L protein may be performed by introducing into a cell the expression vector which carries out the code of each gene. Moreover, each gene may be included in the chromosome of a host cell. It is made discovered in order to make RNP form. The code of NP, P, and the L gene is carried out to the genome of a vector. It does not need to be completely [as NP, P, and L gene] the same. namely, the amino acid sequence of the protein with which a RNP genome carries out the code of the amino acid sequence of the protein in which these genes carry out a code -- even if it does not remain as it is, RNP is formed with Genome RNA, as long as it has the activity which guides this gene expression from RNP, variation may be introduced or the homologous gene of other viruses may be substituted. If RNP is formed, it will be from this RNP. NP, P, and L gene are discovered, RNP reproduces independently by intracellular, and a virus vector is produced with envelope protein.

[0020] the reinfection of the produced virus is carried out to a cultured cell, a hen's egg, an individual (for example, mammals, such as a mouse), etc. -- making -- magnification -- or a passage can be carried out. Moreover, the virus vector of this invention can also be amplified by introducing again RNP formed by reconstruction of a virus vector into host cells, such as LLC-MK2 cell, and cultivating it. This process is in the negative chain

single stranded RNA and the list originating in (a) paramyxovirus. It NP(s), P/C and reaches. L The process which introduces into a cell the complex which consists of protein, and (b) this cell are cultivated, and the process which collects virions from that culture supernatant is included.

[0021] In order to introduce RNP into a cell, it is possible to make complex form and to introduce with lipofectamine, poly cationic liposome, etc. Specifically, various transfection reagents can be used. For example, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. are mentioned. Since decomposition in endosome is prevented, chloroquine can also be added (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: Calos, M.P., 1983, 3015).

[0022] Envelope protein other than the envelope protein in which Genome RNA carries out a code in the case of virus reconstruction may be made to discover in a cell. As such protein, the envelope protein of other viruses, for example, the G-protein of the vesicular stomatitis virus (VSV), (VSV-G) can be mentioned. The paramyxovirus vector of this invention may be a vector containing the envelope protein which originates in viruses other than the virus in which a genome originates like VSV-G protein. Moreover, it is possible to use the chimera protein which has the polypeptide of the origins, such as an adhesion factor which can be pasted up on a specific cell, ligand, and an acceptor, to an extracellular field, and has the polypeptide of the viral-envelope origin to an intracellular field besides the envelope protein of a virus. Thereby, the vector which makes a specific organization a target can also be made. The code of these may be carried out to the viral genome, and they may be supplied by the manifestation of genes other than a genome (for example, gene on another expression vector or a host chromosome etc.) at the time of reconstruction of a virus vector.

[0023] Moreover, in order that the virus vector of this invention may reduce the immunogenicity for example, by SeV protein, or in order to raise the imprint effectiveness and the replicative efficiency of RNA, the virogene contained in a vector may be changed. At least one of NP gene which is a duplicate factor, P/C gene, and the L genes is specifically changed, and it is possible to raise the function of an imprint or a duplicate. Moreover, although HN protein which is one of the structure protein has the activity of both of the hemagglutinin (hemagglutinin) activity and neuraminidase (neuraminidase) activity which are hemagglutinin, if the former activity can be weakened, for example, probably it will be possible to raise the stability of the virus in the inside of blood, and it is also possible by changing the latter activity, for example to adjust infection ability. Moreover, the fusion faculty of membrane fusion liposome can also be adjusted by changing F protein in connection with membrane fusion. Moreover, since it became possible by establishment of a reconstitution system to, analyze the antigen presentation epitope of F protein which can serve as an antigen molecule of cell surface, or HN protein etc. for example, the Sendai Virus which weakened the antigen presentation ability about such protein using this is also producible.

[0024] The virus vector of this invention has a part for carrying out the code of the foreign gene into negative chain single stranded RNA, or inserting a foreign gene. It is possible to use the gene of a request to make it discover in a target cell as a foreign gene. For example, in aiming at gene therapy etc., it inserts the gene for a therapy of the target disease in this virus vector DNA. A foreign gene can be inserted in the lower stream of a river of each gene (NP, P, M, F, HN, and L gene) of a virus (refer to example).

A "lower stream of a river" puts the part which adjoins 3' side in the sense chain which carries out the code of the protein here. namely, — if the lower stream of a river of a gene is 5' side adjoining part of this gene if it is the negative chain RNA (or DNA), and it is the positive chain RNA (or DNA) — 3' of this gene — a side adjoining part is said.

[0025] Especially this invention is useful to restrict the manifestation of a foreign gene. The manifestation level of a foreign gene can be decreased, so that a foreign gene is inserted in the lower stream of a river of a negative chain genome. In this case, it is the paramyxovirus vector which holds a foreign gene and has duplicate ability as a vector of this invention, and the vector to which the foreign gene is located down-stream at least is more desirable than the gene which carries out the code of the virus protein located in the 2nd from 3' edge in the negative chain genome RNA contained in this vector. The 3rd foreign gene [4th / 5th] is more preferably located down-stream at least still more preferably still more preferably from 3' edge in the negative chain genome RNA from the gene which carries out the code of the virus protein located in the 6th still more preferably. Moreover, this invention relates to the approach of controlling the manifestation level of a foreign gene by the paramyxovirus vector of these this inventions. the manifestation level is relatively gone up, so that a foreign gene is located in 3' side of a negative chain genome — it can make — reverse — 5' — manifestation level can be reduced, so that you make it located in a side. When manifestation level wants to fall relatively, between the gene which carries out the code of the virus protein located in the 1st in a foreign gene from 3' edge of the negative chain genome RNA contained in a paramyxovirus vector, and the gene which carries out the code of the 2nd virus protein more — desirable — said — the 2nd and the 3rd between — further — desirable — said — the 3rd and the 4th between — further — desirable — said — the 4th and the 5th between — further — desirable — said — the 5th and the 6th between — further — desirable — said — you make it located between the 6th trailer arrays It is possible for this to control the manifestation of a foreign gene on desired level.

[0026] For example, in wild type paramyxovirus, although virogene is arranged in order of NP, P, M, F, HN, and L sequentially from 3' of a negative genome, it may be arrangement of those other than this in the vector of this invention. Proper before a foreign gene and/or to back, in order to make it not bar the gene expression of order An E-I-S array (conclusion array of imprint-interleaved-array-imprint initiation array) or its part is inserted. For example, when introducing a foreign gene in DNA which carries out the code of the Sendai Virus genome, it is desirable to insert the array which has the number of bases of the multiple of six between the genes which carry out the code of the virus protein (67 Journal of Virology, Vol. No. 8, 1993, p.4822 -4830). The inserted amount of foreignness gene expression can be adjusted according to the class of imprint initiation array added to 5' side (head) of a foreign gene. Moreover, it can adjust according to the base sequence the location of gene insertion, and before and behind a gene.

[0027] As shown in an example, the amount of gene expression inserted (so that it was close to NP gene in the gene arrangement on the genome of a wild type virus) is so high that an insertion point is close to 3' edge of the negative chain RNA in Sendai Virus. In order to obtain the high manifestation of a foreign gene, a foreign gene is most inserted in the lower stream of a river (namely, between the 1st gene and the 2nd genes) of an upstream (3' side of a negative chain) gene among the genes which carry out the code of the virus protein. Specifically in gene arrangement of a wild type genome, a foreign gene

is inserted between the lower stream of a river of NP gene (it sets to a negative chain and is the 5' adjoining part of NP gene), i.e., NP gene, and P gene. If a foreign gene is inserted the 2nd and 3rd in between from the upstream (3' side of a negative chain) among the genes which carry out the code of the virus protein, the manifestation which decreased rather than the case where it inserts the 1st and 2nd in between will be obtained. In this case, it is desirable to insert a foreign gene in gene arrangement of a wild type genome between the lower stream of a river of P gene (for it to set to a negative chain and to be the 5' adjoining part of P gene), i.e., P gene, and M gene. The amount of gene expression inserted (so that it was close to L gene in the gene arrangement on the genome of a wild type virus) is so low that an insertion point is close to 5' edge of the negative chain RNA. If the manifestation which decreased more when the foreign gene was inserted the 3rd and 4th in between from the upstream (3' side of a negative chain) among the genes which carry out the code of the virus protein is obtained and a foreign gene is inserted the 4th and 5th in between, the amount of manifestations will be stopped further low. When inserting a foreign gene the 3rd and 4th in between, it is desirable to insert a foreign gene in gene arrangement of a wild type genome between the lower stream of a river of M gene (for it to set to a negative chain and to be the 5' adjoining part of M gene), i.e., M gene, and F gene. When inserting a foreign gene the 4th and 5th in between, it is desirable to insert a foreign gene in gene arrangement of a wild type genome between the lower stream of a river of F gene (for it to set to a negative chain and to be the 5' adjoining part of F gene), i.e., F gene, and HN gene. In order to suppress the manifestation of a foreign gene low furthermore The upstream of the gene which carries out the code of the virus protein which is down-stream (5' side of a negative chain) most among the genes which carry out the code of the virus protein (in a wild type viral genome) [Namely, between 5' side to the 1st gene, and the 2nd genes;] For obtaining a lower manifestation from 3' side between genes to the 5th gene and the 6th, a foreign gene is inserted down-stream (namely, 5' of a negative chain setting from an edge to a wild type genome during the 1st gene and a trailer array 3' between a side to the 6th gene, and trailer arrays). concrete -- gene arrangement of a wild type genome -- setting -- the upstream (it sets to a negative chain and is the 3' adjoining part of L gene) of L gene, or a lower stream of a river (it sets to a negative chain and is the 5' adjoining part of L gene) -- that is, a foreign gene is inserted between HN gene and L gene or between L gene and a trailer array, respectively. The vector of this invention may hold other foreign genes in the location besides having inserted in this way. The insertion point of a foreign gene can be suitably adjusted so that combination with the gene which carries out the code of the virus protein of order in order to obtain the amount of manifestations of a request of this gene may become the optimal.

[0028] In order to enable it to insert a foreign gene easily, a cloning site can be designed at least in the insertion section. A cloning site can be typically made into the recognition sequence of a restriction enzyme. It twists that the part is likely to exist in a foreign gene to insert preferably, and a restriction enzyme part is designed. As such a restriction enzyme, what has long recognition sequences, such as a restriction enzyme of 8bp recognition, is desirable. as the restriction enzyme of 8bp recognition -- for example -- Asc I (GG**CGCGCC), Fse I (GGCCGG**CC), Not I (GC**GGCCGC), Pac I (TTAAT**TAA), Pme I (GTTT**AAAC), Sfi I (GGCCNNNN**NGGCC), Sgf I

(GCGAT**CGC), Srf I (GCCC**GGGC), Sse232 I (CG**CCGGCG), and Sse8387 I (CCTGCA**GG) -- and -- Although Swa I (ATTT**AAAT) etc. is mentioned, it is not restricted to these. A cloning site is good also as the so-called multi-cloning site which has two or more restriction enzyme recognition sequences. Moreover, you may be the array cut by endonucleases other than a restriction enzyme. Moreover, rearranging a cloning site and inserting a foreign gene by recombination as a recognition sequence of an enzyme is also considered. It can perform designing these arrays in DNA which carries out the code of the viral genome by the well-known variation introducing method. Furthermore, dividing at least the foreign gene insertion section beforehand and considering as a cloning site is also considered. If dephosphorization of the five prime end of the divided vector DNA is carried out, the clone in which the foreign gene was inserted can be produced preferentially. Moreover, if the three-dash terminal of the divided vector DNA is used as the a little salt radical cohesive end of T, it is also possible to carry out cloning of the foreign gene (for the end to be the cohesive end of A) amplified by PCR simple. Since both ends will not separate even if it divides the cloning site if Vector DNA is a circular DNA like a plasmid, high ligation effectiveness can be acquired.

[0029] Insertion of the foreign gene to DNA (vector DNA) which carries out the code of the viral genome For example Hasan and M.K.et al., 1997 and J.General Virology 78 : 2813-2820, Kato, A.et al., 1997, EMBO J.16 : 578-587 and Yu, and D.et al., 1997, and Genes Cells 2: It applies to the publication of 457-466 correspondingly. It can build as follows.

[0030] First, a DNA sample including the cDNA base sequence of a desired foreign gene is prepared. As for a DNA sample, it is desirable that it can check with a plasmid single in electrophoresis by the concentration more than 25 ng/ μ l. Hereafter, a foreign gene is explained taking the case of the case where it inserts in DNA which carries out the code of the viral genome using a NotI part. When a NotI recognition site is included in the target cDNA base sequence, it is desirable to change a base sequence so that the amino acid sequence which carries out a code may not be changed using the site-specific mutation inserting method etc., and to remove a NotI part beforehand. Magnification recovery of the desired gene fragment is carried out by PCR from this sample. In order that the both ends of the amplified fragment may consider as a NotI part and may add the copy of the conclusion array of an imprint of Sendai Virus (E), interleaved array (I) and an imprint initiation array (S), and a (EIS array) to an end further A forward side synthetic DNA array and a reverse side synthetic DNA array (antisense strand) are created as a primer pair in which at least the NotI restriction enzyme cutting section includes an array and the conclusion array of an imprint (E), interleaved array (I) and an imprint initiation array (S), and the array of a part of purpose gene.

[0031] For example, forward side synthetic DNA arrays are two or more nucleotides (the array of the NotI recognition site origins, such as GCG and GCC, is included preferably, and it twists 4 bases) of arbitration to a 5' side, in order to guarantee cutting by NotI. Furthermore, choose ACTT preferably and the NotI recognition site gcggccgc is added to the 3' side. a number of bases which furthermore added the multiple of 6 to the 3' side as a spacer array nine bases of arbitration, or 9 -- adding -- further -- the 3' -- it considers as the gestalt which added the arrays of about 25 bases of ORF including this to the side from the initiation codon ATG of desired cDNA. As for the last base, it is desirable to choose about 25 bases from cDNA of this request, and to consider as the

end of 3' of forward side composition oligo DNA so that it may be set to G or C.
 [0032] a reverse side synthetic DNA array -- two or more nucleotides (four bases in which the array of the NotI recognition site origins, such as GCG and GCC, is not included preferably, still more preferably ACTT) of 5' side to arbitration -- choosing -- the 3' -- a side -- the NotI recognition site gcgccgc -- adding -- further -- the 3' -- the oligo DNA of the insert for adjusting die length is added to a side. The die length of this oligo DNA designs the number of bases so that the sum totals of the complementary strand base sequence of cDNA and the EIS base sequence of the Sendai Virus genome originating in the Sendai Virus mentioned later including the NotI recognition site gcgccgc may become the multiple of 6 (the so-called "Ruhr [of 6] (rule of six)"; Kolakofski, D. et al., J.Virol.72:891-899, 1998). Furthermore, the complementary strand array of S array of Sendai Virus to 3' side of an insert, Preferably 5'-CTTTCACCCT-3' (array number: 1), I array, desirable -- 5 -- '-AAG-3' and the complementary strand array of E array -- desirable -- 5 -- '-TTTTCTTACTACGG-3' (array number: 2) -- further -- the 3' -- die length is chosen and an array is added so that a desired cDNA array may count to a side conversely from a codon from beginning to end and the base of the last of the complementary strand of about 25 bases may be set to G or C to it, and it considers as the end of 3' of reverse side composition oligo DNA.

[0033] The usual method of using for example, ExTaq polymerase (TAKARA SHUZO) can be used for PCR. It carries out using Vent polymerase (NEB) preferably, and after digesting the amplified purpose fragment by NotI, it is inserted in the NotI part of a plasmid vector pBluescript. The base sequence of the acquired PCR product is checked by the sequencer, and the plasmid of a right array is chosen. An insert is cut down by NotI from this plasmid, and cloning is carried out to the NotI part of the plasmid containing Genome cDNA. Moreover, it is also possible to insert in a NotI part directly, without minding a plasmid vector pBluescript, and to obtain recombination Sendai Virus cDNA.

[0034] DNA which carries out the code of the viral genome connects a suitable transcriptional promoter, builds Vector DNA, can make this able to imprint by the inside of a test tube, or intracellular, can make RNP able to reconfigure under L of a virus, P, and coexistence of NP protein, and can make the virus vector containing this RNP generate. This invention offers the manufacture approach including the process which makes DNA which carries out the code of the genome of the paramyxovirus vector of this invention under L of paramyxovirus, P, and coexistence of NP protein imprint of this vector. Moreover, this invention offers DNA for paramyxovirus vector manufacture of this invention which consists of this DNA. Moreover, this invention relates to use of DNA which carries out the code of the genome of this vector for manufacturing the paramyxovirus vector of this invention. Reconstruction of the virus from the virus vector DNA can be performed according to a well-known approach (international public presentation [international public presentation / 97/No. 16539 /;] 97/No. 16538;). [Durbin, A.P. et al., 1997,] [Virology] 235 : 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, and Proc. Natl.Acad.Sci.USA 92 : 8388-8392; Schnell. M. J. et al., 1994, and EMBO J.13 : 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, and EMBO J.14 : 5773-5784; Lawson, N. D. et al. and Proc.Natl. Acad.Sci.USA 92 : 4477-4481; Garcin and D. et al., 1995, EMBO J.14 : 6087-6094; Kato, A. et al., and 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron and M.D. and Barrett, T., 1997, J.Virol.71

: 1265–1271; Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93 : 15400–15404. A virus can be made to reconfigure the virus vector of Paramyxoviridae containing parainfluenza, the vesicular stomatitis virus, a rabies virus, a measles virus, a RINDAPESUTO virus, Sendai Virus, etc. from DNA by these approaches.

[0035] For example, because a DNA molecule passes to the cell membrane of the approach of it being suitable for taking in by the cell of the following approaches, the approach of making the DNA precipitate which can incorporate the cell of the ** purpose, and the ** purpose, and having few cytotoxic positive charge properties in the approach of introducing Vector DNA into intracellular which makes the complex containing DNA, and the ** purpose, the method of making sufficient hole momentarily by the electric pulse etc. is in it.

[0036] ** If it carries out, various transfection reagents can be used. For example, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. are mentioned. ** Although DNA which the transfection method using calcium phosphate was mentioned and went into intracellular by this approach is incorporated by the englobement vesicle if it carries out for example it is known that DNA of amount sufficient also in a nucleus will enter (and Silverstein Graham, F.L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, and M. —) S., 1977, and Cell 11: 223. Chen and Okayama consider optimization of a transfer technique. 1) They are the incubation conditions of a coprecipitation Mr. object about a cell. 2 to 4% CO₂, A thing more nearly annular than the shape of a straight chain has [35 degrees C, 15 – 24 hours, and 2 DNA] high activity. 3) The DNA concentration in precipitate mixture When it is 20–30microg/ml, it is reported that the optimal precipitate is obtained (Mol.Cell.Biol.7: Chen, C. and Okayama, H., 1987, 2745). ** The approach is suitable for passing away–transfection. It prepares in ancient times by the DNA ratio of concentration of a request of DEAE–dextran (Sigma #D–9885 M.W.5x10⁵) mixture, and the method of performing transfection is learned. Since many of complex will be disassembled in endosome, chloroquine can also be added in order to heighten effectiveness (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: Calos, M.P., 1983, 3015). ** An approach is an approach called the electric terebration and is high at the point that there is no cell selectivity, compared with the approach of ** or **. [of versatility] Effectiveness is made good under the optimum conditions of the conductivity of a buffer, DNA concentration, and cell density in the strength of the persistence time of pulse current, a pulse form, and electric field (an inter–electrode gap, electrical potential difference).

[0037] As mentioned above, since many specimens can be examined using a lot of [that the approach of ** has simple actuation, and] cells in three categories, in this invention, the transfection reagent is suitable. suitable — Superfect Transfection Ragent (QIAGEN, CatNo.301305) — or — DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No.1811169) is used.

[0038] Reconstruction from cDNA can specifically be performed as follows. With a plastics plate or 100mm Petri dish of 6 hole extent etc., from 24 holes 10% fetal calf serum (FCS) and an antibiotic () [100] units/ml It cultivates until it becomes confluence (1x10⁶ cell) 70 to 80% about ape kidney origin cell strain LLC–MK2 using the minimum essential medium (MEM) containing penicillin G and 100microg [/ml] streptomycin. For example Under 1microg/ml psoralen (psoralen) existence Carried out inactivation of the UV irradiation processing by processing for 20 minutes. T7 polymerase the recombination

vaccinia virus vTF 7-3 (Fuerst, T.R. et al., and Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8122- 8126, 1986, and Kato — A. et) to discover al. and Genes Cells 1: 569-579 and 1996 are infected in 2 PFU / cell. The addition and UV irradiation time amount of the psoralen can be adjusted suitably. 1 hour after infection and 2-60microg — more — desirable — Above-mentioned recombination Sendai Virus cDNA of 3-5microg The plasmid which discovers the virus protein which acts on a transformer indispensable to generation of an overall-length Sendai Virus genome (pGEM-N 24-0.5microg) pGEM-P of 12-0.25microg, and pGEM-L of 24-0.5microg, More preferably pGEM-N of 1microg, pGEM-P of 0.5microg, And transfection is carried out by the RIPOFE cushion method using Superfect (QIAGEN) etc. with pGEM-L (Kato, A. et al., Genes Cells 1:569-579, 1996) of 1microg. The cell which performed transfection by request 100microg [/ml] rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC), It cultivates by MEM of blood serum non-** which contains only 40microg [/ml] cytosine arabinoside (AraC) (Sigma) more preferably. The cytotoxicity by the vaccinia virus is minimized, and the optimum density of drugs is set up so that recovery of a virus may be made into max (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579). Cells are collected from transfection after culture for about 48 to 72 hours, and after repeating freeze thawing 3 times and crushing a cell, transfection is carried out to LLC-MK2 cell and it cultivates. Or you collect culture supernatants, and make it added and infected with the culture medium of LLC-MK2 cell, and it cultivates. Culture medium is collected three - seven days after culture. Or multistory [of the collected cell] may be carried out to another cell, and it may be cocultivated. Or the cell debris by the above-mentioned freeze thawing may be inoculated into the allantoic membrane of the growth hen's egg of ten ages in day, and urine water may be collected about three days after. The virus titer contained in a culture supernatant or urine water can be determined by measuring hemagglutination activity (HA). HA is a "endo-point dilution method" (it Kato(es)). A. et al., 1996, and GenesCells 1 : 569-579; Yonemitsu, Y.& Kaneda, Y., and Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: By pp.295-306 and 1999 It can determine. In order to remove the vaccinia virus vTF 7-3 which can be mixed, the obtained urine water sample can be diluted suitably (for example, 106 twice), and it can be made to re-amplify by the hen's egg. Re-magnification is repeatable for example, on 3 times. The obtained virus stock can be saved at -80 degrees C.

[0039] The collected paramyxovirus can be refined so that it may become pure substantially. The purification approach can be performed by the well-known purification / separation approach including fill tray SHON, centrifugal separation, column purification, etc. "It is purity substantially" means accounting for rates with the isolated matter (a compound, a polypeptide, or virus) main as a component in the sample in which it exists. Typically, the whole which exists in a sample and which doubled other components in a sample is desirable 50% or more, and a pure component occupies 90% or more still more preferably 80% or more more preferably 70% or more substantially. With a well-known procedure, a rate is computed by this contractor by a weight ratio [w/w] etc. Naturally except for the solvent, the salt, the addition compound, etc., it should be computed. The approach (WO 97/32010) of for example making it sticking to the approach (JP,62-30752,B, JP,62-33879,B, and JP,62-30753,B) using a cellulose sulfate or a bridge formation poly saccharide sulfate as the concrete purification approach of paramyxovirus

and a fucose sulfuric-acid content polysaccharide, and/or its decomposition product etc. can be illustrated.

[0040] The recombination Sendai Virus vector of this invention can be suitably diluted with a physiological saline, phosphate buffered saline (PBS), etc., and can be used as a constituent. Urine water can also be included when the recombination Sendai Virus vector of this invention is proliferated by the hen's egg. The support or the media which can be permitted physiologically, such as deionized water and 5% glucose water solution, may be included in the recombination Sendai Virus vector content constituent of this invention. "The support or the medium" permitted physiologically can prescribe a medicine for the patient with a vector, and is an ingredient which does not check the transgenics by the vector intentionally. Furthermore, in addition to this, vegetable oil, suspension, the surfactant, the stabilizer, the biocide, etc. may contain. Moreover, a preservative and other additives can be added.

[0041] As long as a virus vector reconfigurates, especially the host cell used for reconstruction is not restricted. For example, in reconstruction of a Sendai Virus vector, cultured cells, such as a valve flow coefficient-1 cell of the ape kidney origin, and LLC-MK2 cell, a BHK cell of the hamster kidney origin, a Homo sapiens origin cell, etc. can be used. The infectivity virion which has the envelope can also be obtained by making the suitable envelope protein for these cells discover. Moreover, in order to obtain a Sendai Virus vector in large quantities, the virus vector obtained from the above-mentioned host is infected with a growth hen's egg, and this vector can be amplified. The manufacture approach of the virus vector using a hen's egg is already developed (the volumes on inside west, (1993), "the advanced technology protocol III of neuroscience research and molecule nerve cell physiology", a welfare company, Osaka, and pp.153-172). A fertilized egg is put into an incubator and, specifically, it is for nine - 12 days. It cultivates at 37-38 degrees C, and a germ is grown up. A Sendai Virus vector is inoculated into an allantoic cavity, an egg is cultivated for several days, and a virus vector is proliferated. Conditions, such as incubation period, may change by the recombination Sendai Virus to be used. Then, urine water including a virus is collected. Separation and purification of the Sendai Virus vector from urine water can be performed according to a conventional method (Masato Tashiro, a "virus experiment protocol", Nagai, the Ishihama editorial supervision, a MEJIKARU view company, pp.68-73, (1995)).

[0042] If a virus vector is prepared using the gene for a therapy of a disease as a foreign gene, it will become possible to prescribe this vector for the patient and to perform gene therapy. It is possible to make the immanency gene which runs short of supply in the body of the foreign gene or patient who can expect a curative effect discover as application to the gene therapy of the virus vector of this invention by any approach of the gene expression by direct administration and the gene expression by indirect (ex vivo) administration. The virus vector of this invention has high safety, and since the amount of manifestations of a foreign gene is further controllable, it is expected that it can respond to broad clinical application. As a foreign gene, especially a limit may be a nucleic acid which does not carry out the code of the protein, such as antisense one or a ribozyme, in addition to the nucleic acid which there is not and carries out the code of the protein. Moreover, if the gene which carries out the code of the bacteria about an infectious disease or the antigen of a virus as a foreign gene is used, in this animal, immunity can be guided by medicating an animal with this. That is, it can use as a

vaccine. This invention is also applicable to the high virus of the need for a vaccine like pathogenic paramyxovirus, for example, a measles virus, and a mumps virus.

[0043] When using as a vaccine, it is possible to apply the virus vector of this invention to a neoplasm, an infectious disease, and other general diseases. For example, the gene which uses the vector of this invention for antigen presenting cells (APC), such as a tumor cell or DC cell, and has a curative effect as an oncotherapy can be made to discover. as such a gene -- cancer antigen Muc-1 or -- A Muc-1 Mr. mucin tandem repeat peptide (U.S. Pat. No. 5,744,144) and melanoma gp100 antigen etc. is mentioned. As for the therapy with such a gene, the broad application of a breast cancer, colon cancer, a pancreatic cancer, a prostatic cancer, lung cancer, etc. is shown. Moreover, it is also effective to combine the cytokine which heightens an adjuvant effect. as such a gene -- for example -- iIL-2 and single strand IL-12 combination (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96 (15):8591-8596, 1999) -- ii) IL-2 and interferon gamma (U.S. Pat. No. 5,798,100), iii) The granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) used independently and GM-CSF which made iv brain tumor applicable to a therapy IL-4 Combination (J.Neurosurgery 90 (6) and 1115-1124) etc. is mentioned (1999).

[0044] As a therapy of an infectious disease, it sets to influenza. For example, highly toxigenic strain H5N1 In a mold envelope and Japanese encephalitis For example, it sets to an envelope chimera (Vaccine, vol.17, No.15-16, and 1869-1882 (1999)) and an acquired immunodeficiency syndrome. For example, HIV gag or SIV gag Protein (J.Immunology (2000) vol.164, 4968-4978), The vaccine therapy by internal use of HIV envelope protein, the administration wrapped in a polylactic acid-glycol copolymer (Kaneko, H.et al., and Virology 267:8-16 (2000)), In cholera For example, B subunit of a cholera toxin (CTB) () [Arakawa, T., et al., Nature Biotechnology (1998) 16 (10):934-8, Arakawa, T.,] [et] al. and Nature Biotechnology 16 (1998) (3): In 292-7 and rabies For example, the sugar protein of a rabies virus (Lodmell and D.L.et al., 1998, Nature Medicine 4(8):949-52), In a cervical carcinoma, the capsid protein L1 (J.Med.Virol, 60, and 200-204) of Homo sapiens papillomavirus 6 mold etc. is mentioned (2000).

[0045] In using the vector of this invention as a vaccine, in order to raise immunogenicity, immunostimulants, such as cytokine, a cholera toxin, and the Salmonella toxin, are also combinable. moreover -- a vaccine -- an alum, an imperfect Freund's adjuvant, MF59 (oil emulsion), and MTP-PE (muramyl tripeptide of the mycobacteria cell wall origin) -- and -- The adjuvant (soapbark tree Quilaja saponaria origin) of QS-21 etc. is also combinable.

[0046] Moreover, application with a general disease is also considered. As for **, the manifestation of the peptide of ** and an insulin fragment is performed for example, to the I-beam diabetes-mellitus model animal at diabetes mellitus (Coon, B.et al., J.Clin.Invest., 1999, 104(2):189-94).

[0047] Although it changes with a disease, a patient's weight, age, sex, a symptom, the administration purpose, an administration gestalt, medication methods, etc., if the dose of a vector is this contractor, it can be determined suitably. Preferably, the amount of vectors contained in an administration constituent is good in it being within the limits of about 10^{11} pfu [from about 10^5 pfu/ml]/ml. The amount of the vector contained in an administration constituent is good more preferably in it being within the limits of about 10^9 pfu [from about 10^7 pfu/ml]/ml. It is desirable to prescribe the amount of abbreviation 5×10^8 pfu [from abbreviation 1×10^8 pfu/ml]/ml within the limits for the

patient most preferably in the support in which admission on pharmaceutical sciences is possible.

[0048] In addition, if an RNA dependent RNA polymerase inhibitor is prescribed for the patient during a therapy when a therapy needs to be completed and it is necessary to inhibit growth of a virus vector or, only growth of a virus vector can be inhibited specifically, without inflicting a failure on a host.

[0049]

[Example] Hereafter, although an example explains this invention to a detail further, this invention is not restricted to these examples.

[Example 1] Control of the amount of gene expression using the polar effect in Sendai Virus The construction > Sendai Virus (SeV) overall-length genome cDNA of the I^KSeV genome cDNA, pSeV(+) (Kato, A. et al., and Genesto Cells 1: It is new to cDNA of 569-579 and 1996). Not I The site was introduced between the start (S) signal of each gene, and the ATG translation start signal. As an introductory approach, first, the band which separates the fragment (2645bp) which digested pSeV (+) by Sph I/Sal I, the fragment (3246bp) digested by Cla I, and the fragment (5146bp) digested by Cla I/Eco RI by agarose electrophoresis, respectively, and corresponds like drawing 1 (A) was cut down, and it collected and refined by QIAEXII Gel Extraction System (product made from QIAGEN). The fragment digested by Sph I/Sal I is the fragment digested by LITMUS38 (product made from NEW ENGLAND BIOLABS), and Cla I, and a fragment digested by Cla I/Eco RI. Ligation was carried out to pBluescriptII KS+ (product made from STRATAGENE), and subcloning was carried out to it. Then, Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (product made from STRATAGENE) was used for installation of a Not I site. the primer used for each installation -- between NP-P -- sense chain: -- 5 -- 'ccaccgaccacaccagcgccgcgacagccacggcttcgg-3' (array number: 3) -- Antisense strand : 5'-ccgaagccgtggctgtcgccgctgggtgtggtcgggtgg-3' (array number: 4), between P-M -- sense chain: -- 5 -- 'gaaatttcacctaagcgccgcaatggcagatatctatag-3' (array number: 5) -- Antisense strand : 5'-ctatagatatctgccattgcccgcgcttaggtgaaatttc-3' (array number: 6), between M-F -- sense chain: -- 5 -- 'gggataaagtcccttgccgcttggttgcaaaactctcccc-3' (array number: 7) -- Antisense strand : 5'-ggggagagttttgcaaccaagcgccgcaagggaactttatccc-3' (array number: 8), between F-HN -- sense chain: -- 5 -- 'ggtcgcgcggtactttagcgccgcctcaaacaagcacagatcatgg-3' (array number: 9) -- Antisense strand : 5'-ccatgatctgtgcttgtttgaggcgccgctaaagtaccgcgcgacc-3' (array number: 10), between HN-L -- sense chain: -- 5 -- 'cctgcccattccatgacctagcgccgcttcccattcaccctggg-3' (array number: 11) -- Antisense strand: 5'-cccaggggtgaatgggaagcgccgctaggtcatggatgggcagg-3' (array number: 12) was compounded, respectively, and was used.

[0050] According to the protocol of Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit, it introduced [as mold] using that to which subcloning of the Cla I/Eco RI fragment was carried out by the above between a ClaI fragment and F-HN and between HN-L, respectively between a SalI/SphI fragment and P-M and between M-F between NP-P. It digested with the enzyme which carried out subcloning of what was introduced again, and collected and refined similarly, and the assembly was carried out to the original SENDAI genome cDNA. Consequently, five kinds (pSeV(+) NPP and pSeV (+) PM, pSeV(+) MF, pSeV(+) FHN, and pSeV(+) HNL) of Sendai Virus genomes cDNA which newly introduced NotI between each gene like drawing 1 (B) were built. It is the above-mentioned genome

about the DNA fragment with which the conclusion signal-interleaved-array-start signal (E-I-S) was added to the lower stream of a river of a foreign gene in order to have inserted the foreign gene. cDNA It inserts in a NotI site. for this reason -- being alike -- for example, the multi-cloning site and the conclusion signal-interleaved-array-start signal prepare beforehand the array (refer to drawing 2) inserted into two NotI sites, and it is simple to insert a foreign gene in a multi-cloning site.

[0051] In order to insert a foreign gene in the lower stream of a river of L gene for example, pSeV (+) or SeV cDNA (pSeV18+ --) of the above-mentioned request pSeV(+) NPP and pSeV (+) PM, pSeV(+) MF, pSeV(+) FHN and pSeV (+) Restriction enzyme which exists between the termination codon of L gene, and the conclusion signal of an imprint in HNL etc. Kpn I A gene can be inserted in a site (drawing 3 (A)). In that case, in the foreign gene to insert, it is a both-ends side. KpnI A conclusion signal-interleaved-array-start signal is made to add to site and 5' side by PCR etc. (drawing 3 (B)). It is SeV cDNA about DNA made to add. It incorporates and cDNA by which the foreign gene was inserted in the lower stream of a river of L gene is obtained.

[0052] Subcloning of the Homo sapiens secretor alkaline phosphatase (SEAP) was carried out by PCR as a reporter gene for seeing the amount of gene expression. a primer -- Asc I 5' primer: which added the restriction enzyme site -- 5 -- 'gcgggcgcgccatgctgctgctgctgctgctgctggcctg-3' (array number: 13) and 3 -- 'primer:5'-gcgggcgcgcccttatcatgtctgctgcaagcgggccggccg-3' (array number: 14) was compounded, and PCR was performed. In mold, it is Pfu turbo to pSEAP-Basic (product made from CLONTECH), and an enzyme. DNA polymerase (product made from STRATAGENE) was used. The product was digested by Asc I after PCR, and electrophoresis refined and recovered. As a plasmid which carries out subcloning Not of pBluescriptII KS+ It is a multi-cloning site () to I site. [Pme] I-Asc I-Swa I) and a conclusion signal-interleaved-array-start signal **** composition double-stranded-DNA [sense chain :

5'-gcgggcgcggtttaaacggcgcgccatttaaatccgtagtaagaaaaacttagggtgaaagttcatcgcgggccgc-3' (array number : 15), Antisense strand: The thing incorporating

5'-gcgggcgcgatgaactttcaccctaagttttcttactacggatttaaatggcgcgccggtttaaacgcgggccgc-3' (array number: 16)] was produced (drawing 2). Ligation of the PCR product refined and collected was carried out to the Asc I site of this plasmid, and it carried out cloning to it. This was digested by Not I, and the SEAP gene fragment was collected and refined by electrophoresis, and ligation was carried out to the Not I site of five kinds of above-mentioned Sendai Virus genomes cDNA, and pSeV18+, respectively, and it included in it. Each virus vector was set to pSeV(+) NPP/SEAP, pSeV(+) PM/SEAP, pSeV(+) MF/SEAP, pSeV(+) FHN/SEAP, pSeV(+) HNL/SEAP, and pSeV18(+)/SEAP.

[0053] It is <reconstruction of virus> LLC-MK2 cell 2x10⁶ cells/dish It plants on 100mm petri dish. After culture 24 hours after, T7 polymerase which carried out UV processing with the psoralen the recombinant vaccinia virus (PLWUV-VacT7) (it Kato(es) Fuerst, T.R.et al., and Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8122- 8126 and 1986 --) to discover A.et al. and Genes Cells 1: You made it infected with 569-579 and 1996 at a room temperature moi=2 for 1 hour. Each Sendai Virus cDNA which incorporated SEAP after washing the cell pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L, respectively 12microg, It suspends in OptiMEM (product made from GIBOCO BRL) in the quantitative ratio of 4microg, 2microg, and 4microg/dish. 110microl SuperFecttransfection reagent (product made from QIAGEN)

was put in, and it mixed, and at the room temperature, OptiMEM 3ml which finally contains FBS 3% after 15-minute neglect was added, and it added into the cell, and cultivated for 3 to 5 hours. The cell was washed twice after culture by MEM which does not contain a blood serum, and it cultivated by MEM containing cytosine beta-D-arabino furanoside (AraC) for 72 hours. These cells were collected, the pellet was suspended in 1ml PBS, and freeze thawing was repeated 3 times. Urine water was collected, after doing 100microl inoculation of and carrying out incubation to the hen's egg to which incubation of these was carried out for ten days for three days at 35 degrees C. a vaccinia -- the urine water these-collected in order to make it virus-free -- further 10⁻⁵ to 10⁻⁷ It diluted and the reinoculation was carried out to the hen's egg, and it collected similarly, it poured distributively, and stocked at -80 degrees C. Each virus vector name is set to SeVNPP/SEAP, SeVPM/SEAP, SeVMF/SEAP, SeVFHN/SEAP, SeVHNL/SEAP, and SeV18/SEAP.

[0054] <measurement of titer by plaque assay> valve flow coefficient-1 cell -- 6well(s) a plate -- per 1well -- every [5x10⁵ cells] -- it planted and cultivated for 24 hours. After [which was diluted with BSA/PBS (1% BSA in PBS) after PBS washing to 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷] rearranging and carrying out the incubation of the SeV for 1 hour, Multistory [of washing and every 3ml per well of the BSA/MEM/agarose (what mixed BSA+2xMEM and equivalent 2% agarose 0.2%)] is carried out by PBS, and it is CO₂ 5% 37 degrees C for six days. It cultivated. 3ml ethanol/acetic acid (ethanol: acetic-acid =1:5) were added after culture, and it was left for 3 hours, and removed with agarose. The incubation was carried out at the room temperature for 1 hour by the rabbit anti-Sendai Virus antibody diluted with PBS 100 times after 3 times washing. Alexa FlourTM diluted with PBS 200 times after 3 times washing The indicator goat anti-rabbit Ig (G+H) (Molecular Probe) was added, and the incubation was carried out at the room temperature for 1 hour. The fluorescence image was captured with the RUMINO image analyzer LAS 1000 (Fuji film) after 3 times washing by PBS, and the plaque was measured. A result is shown in drawing 4 . Moreover, the result of the titer obtained from now on is shown in Table 1.

[0055]

[Table 1] The result of the titer of the class substitute Sendai Virus measured from the

組み換えウイルス	タイター (pfu/ml)
SeV18/SEAP	3.9X10 ⁹
SeVNPP/SEAP	4.7X10 ⁸
SeVPM/SEAP	3.8X10 ⁹
SeVMF/SEAP	1.5X10 ¹⁰
SeVFHN/SEAP	7.0X10 ⁹
SeVHNL/SEAP	7.1X10 ⁹

result of plaque assay _____

[0056] <comparison of reporter gene manifestation> LLC-MK2 cell -- 6well(s) a plate -- every [5x10⁵ cells / per / 1 / 1well -] -- after planting and cultivating for 24 hours,

each virus vector is infected in moi=2 -- making -- a 24 hours after culture supernatant -- 100microl It collected and SEAP assay was performed. Assay was performed by Reporter Assay Kit-SEAP- (Toyobo) and was measured with the RUMINO image analyzer LAS 1000 (Fuji film). Measured value set the value of SeV18+/SEAP to 100, and expressed it as a relative value, respectively. Consequently, SEAP activity was detected even when a SEAP gene was inserted in which location shown in drawing 5 . It turned out that SEAP activity fell as it was located in the lower stream of a river of a genome, namely, the amount of manifestations has fallen. The amount of SEAP gene expression carried out monotone reduction as the insertion point went down-stream (L side) from the upstream (NP side) of a genome. For example, when a SEAP gene was inserted between NP gene and P gene, the middle amount of manifestations of the vector which inserted the SEAP gene in the upstream of NP gene, and the vector which inserted the SEAP gene between P gene and M gene was detected.

[0057] The <production of multi-cloning site> multi-cloning site was made to add to a SeV vector. An approach is the following two kinds.

1) The Sendai Virus (SeV) overall-length genome cDNA pSeV18+b (+) (it Hasan(s)) M.K.etal., 1997, and J.General Virology 78: Some restriction enzyme sites in the genome of 2813-2820("pSeV18+b (+)" says "pSeV18+") cDNA are broken. A new restriction enzyme site including the crushed restriction enzyme site was introduced between the start signal of each gene, and the ATG translation start signal (drawing 6).

2) Make a multi-cloning site array and the conclusion signal of imprint start signal-interleaved-array-add to the already built SeV vector cDNA, and include in a NotI site (drawing 7).

[0058] In 1), as an introductory approach, it is drawing 6 first (A). pSeV18+ The band which separates the fragment (2644bp) digested by Eag I, the fragment (3246bp) digested by Cla I, the fragment (5146bp) digested by ClaI/Eco RI, and the fragment (5010bp) digested by Eco RI by agarose electrophoresis, respectively, and corresponds was cut down, and it collected and refined by QIAEXII Gel Extraction System (product made from QIAGEN). Ligation of the fragment which the fragment digested by Eag I digested by LITMUS38 (product made from NEW ENGLANDBIOLABS), the fragment with which it digested by Cla I, the fragment digested by ClaI/Eco RI, and Eco RI was carried out to pBluescriptII KS+ (product made from STRATAGENE), and it carried out subcloning to it. Then, Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (product made from STRATAGENE) was used for destruction of a restriction enzyme site, and installation.

[0059] For destruction of a restriction enzyme site, Sal I:(sense

chain)5'-ggagaagttctcaacaccgtccacccaagataatcgatcag-3' (array number: 17),

5'-ctgatcgattatcttgggtggacgggtgttgagacttctcc-3' (array number: 18), (Antisense strand)

Nhe I: (sense chain) 5'-gtatatgtgttcagttgagcttgctgtcggtctaaggc-3' (array number: 19),

5'-gccttagaccgacagcaagctcaactgaacacatatac-3' (array number: 20), (Antisense strand)

Xho I: (sense chain) 5'-caatgaactctctagagaggctggagtcactaaagagttacctgg-3' (array number: 21),

5'-ccaggtaactcttagtgactccagcctctctagagagttcattg-3' (array number: 22), (Antisense strand)

moreover -- restriction enzyme installation -- : between NP-P (sense chain) --

5 -- 'gtgaaagttcatccaccgatcggctcactcgaggccacacccaacccaccg-3' (array number: 23)

-- 5'-cgggtgggttgggtgtggcctcgagtgagccgatcgggtggatgaactttcac-3' (array number: 24),

(Antisense strand) Between P-M : (sense chain)

5'-cttagggtgaaagaaatttcagctagcacggcgcaatggcagatatc-3' (array number: 25),

5'-gatatctgccattgcgcgctgtagctgaaatttctttcaccctaag-3' (array number: 26), (Antisense strand) Between M-F : (sense chain)

5'-cttagggataaagtcccttgtgcgcgcttggttgcaaaactctcccc-3' (array number: 27),

5'-ggggagagttttgcaaccaagcgcgcacaaagggactttatccctaag-3' (array number: 28), (Antisense strand) Between F-HN : (sense chain)

5'-ggtcgcgcggtacttttagtcgacacctcaaacaagcacagatcatgg-3' (array number: 29),

5'-ccatgatctgtgcttgtttgaggtgtcgactaaagtaccgcgcgacc-3' (array number: 30), (Antisense strand) Between HN-L : (sense chain)

5'-cccagggtgaatgggaagggccggccaggatcatggatgggcaggagtcc-3' (array number: 31),

(Antisense strand) 5'-ggactcctgcccattccatgacctggccggcccttcccattcaccctggg-3' (array number: 32) was compounded, respectively, and it used for the reaction. Each fragment was collected and refined like the above after installation, and the assembly of the cDNA was carried out (drawing 6 (B)).

[0060] In 2), 5(sense

chain)'-ggccgcttaattaacggtttaaacgcgcgccaacagtgttgataagaaaaacttagggtgaaagttcatcac-3' (array number: 33),

5'-ggccgtgatgaactttcaccctaagtttttattatcaaacactgttggcgcgcgtttaaacggttaattaagc-3' (array number: 34) is compounded. (Antisense strand) Each synthetic DNA is phosphorized and they are 15 minutes, 37 degree-C 15 minute, and a room temperature 65 degrees C 85 degrees C for 2 minutes. Annealing is carried out in 15 minutes and it includes in SeV cDNA. Or by the conclusion signal-interleaved-array-start signal **** primer, PCR of the multi-cloning sites, such as pUC18 or pBluescriptII, is carried out, they carry out subcloning, and this is included in SeV cDNA. Virus reconstruction by obtained cDNA is performed as above-mentioned.

[0061] [Example 2] Control of the amount of gene expression using the polar effect in Sendai Virus The Not I site was introduced into construction of the II<SeV genome cDNA, and cDNA of the recovery > Sendai Virus (SeV) overall-length genomes cDNA and pSeV of a virus (+) between the translation termination codon of L gene, and the conclusion signal of an imprint. As an introductory approach, first, like drawing 8 , the band which separates the fragment (5010bp) which digested pSeV (+) by Eco RI by agarose electrophoresis, and corresponds was cut down, and it collected and refined by QIAEXII Gel Extraction System (product made from QIAGEN). Ligation of the collected fragment was carried out to pBluescriptII SK+ (product made from STRATAGENE), and it carried out subcloning to it. Then, restriction enzyme Not I Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (product made from STRATAGENE) was used for installation of a site. a primer — sense side: — 5 — '-cgtgcagaacgatcgaagctccgcggccgctggaagtcttggaactgtcc-3' (array number: 35) side and an antisense side — :5 —

'-ggacaagtccaagacttcagcggccgcggagcttcgatcgttctgcacg-3' (array number: 36) was compounded, respectively, and it used for the reaction. The fragment (2010bp) digested by Xho I-Mlu I was collected and refined like the above after installation, and the assembly of the cDNA was carried out (drawing 8).

[0062] Subcloning of Homo sapiens Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) was carried out by PCR as a gene for seeing the amount of gene expression. primer 5' primer: which added the restriction enzyme Asc I site — 5 —

'-gcggcgcgcgaaccatgaactttctgctgtcttgggtgcattgg-3' (array number: 37) and 3 —

'primer:5'-gcggcgcgcctcaccgcctcggcttgcacatctgcaagt-3' (array number: 38) was

compounded, and PCR was performed. In an enzyme, it is KOD-plus. – DNA polymerase (product made from TOYOBO) was used. The product was digested by Asc I after PCR, and electrophoresis refined and recovered. The plasmid for making the conclusion signal of imprint-interleaved-array-imprint start signal of Sendai Virus add to this was built (drawing 9). Mlu I-Sph of pSeV18+ I fragment (3317bp) Incorporated LITMUS38 (With pAC114) carrying out A conclusion signal-interleaved-array-start signal and a cloning site (Asc I-Pme I) the included synthetic double stranded DNA (sense chain: — 5 — '—ggccgctaagaaaaacttagggtgaaagttcacttcacgagggcgcgccgtttaaactgc—3' (array number: 39) —) Antisense strand: pAG180 incorporating

5'—ggccgcagtttaaaccggcgcgccctcgtgaagtgaactttcaccctaagttttcttagc—3' (array number: 40) was produced (drawing 9). Ligation of the VEGF PCR product refined and collected was carried out to the AscI site of this plasmid, and it carried out cloning to it. This was digested by Not I, and the VEGF gene fragment was collected and refined by electrophoresis, and ligation was carried out to the Not I site of the Sendai Virus genome cDNA, and it included in it. The virus vector cDNA was made into pSeV+L/VEGF.

Moreover, what included the conclusion signal-interleaved-array-start signal (refer to drawing 2) created by the approach of example 1 publication in the lower stream of a river of VEGF cDNA at a bond, pSeV18+, and pSeV(+) HNL (each is made into pSeV18+/VEGF and pSeV(+) HNL/VEGF) was built for the comparison of the amount of manifestations. Viruses were collected from each cDNA as the conventional approach, and it considered as SeV18+/VEGF, SeVHNL/VEGF, and SeVL/VEGF, respectively.

[0063] They are 6well(s) about <comparison of amount of manifestations> LLC-MK2 cell. After planting every 5x10⁵ cellses per 1well on the plate and cultivating for 24 hours, each virus vector was infected in moi=5, 200microl recovery of a 24 hours after culture supernatant was done, and ELISA performed the quantum of VEGF in a culture supernatant. The result is shown in drawing 10 . It turned out that it falls about by 1/10 from the time of the amount of manifestations of VEGF including in the upstream of NP gene because this includes in the lower stream of a river of L gene. this invention persons are indicating that the amount of manifestations can be changed by changing an imprint start signal (WO 01/18223), and it is expected by combining this that the width of face of control of the amount of manifestations spreads further.

[0064]

[Effect of the Invention] The paramyxovirus vector which has the duplicate ability which can introduce a foreign gene by this invention was offered. The vector of this invention can control manifestation level by adjusting the insertion point of a foreign gene. The manifestation level of a foreign gene can be low stopped by inserting a foreign gene in a negative chain genome especially. Moreover, production of the virus vector by which the foreign gene was inserted in two or more kinds of parts is also considered. Since especially a Sendai Virus vector is very high and can control the manifestation level of a foreign gene by this invention further to a cell strain also with extensive transgenics effectiveness, use to the transgenics in living bodies, such as gene therapy, is expected.

[0065]

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> DNAVEC-Research-INC.<120> Paramyxovirus-vectors used-for-transduction of-foreign-genes<130> D3-X0002Y1<140><141><150> JP 2000-152726<151> 2000-05-18<150> CA 2322057<151> 2000-10-27<160> 40 <170>

PatentIn Ver. 2.0 <210> 1 <211> 10<212> DNA <213> Artificial Sequence<220> <223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 1ctttcaccct 10
 <210> 2 <211> 15<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of
 Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 2tttttcttac tacgg 15 <210> 3
 <211> 41<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial
 Sequence: artificially synthesized sequence <400> 3 ccacgcacca caccagcgg ccgcgacagc
 caggcttcg g 41 <210> 4 <211> 41<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 4 ccgaagccgt
 ggctgtcgcg gccgctgggt gtggtcgggtg g 41 <210> 5 <211> 40<212> DNA<213> Artificial
 Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 5 gaaatttcac ctaagcggcc gcaatggcag atatctatag 40 <210> 6 <211> 40<212> DNA
 <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence <400> 6 ctatagatat ctgccattgc ggccgcttag gtgaaatttc 40 <210> 7
 <211> 43<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial
 Sequence: artificially synthesized sequence <400> 7 gggataaagt cccttgccgc cgcttggtg
 caaaactctc ccc 43 <210> 8 <211> 43<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 8 ggggagagtt
 ttgcaaccaa gcggccgcaa gggactttat ccc 43 <210> 9 <211> 47<212> DNA<213> Artificial
 Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 9 ggtcgcgcgg tactttagcg gccgcctcaa acaagcacag atcatgg 47 <210> 10 <211>
 47<212> DNA<213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence:
 artificially synthesized sequence <400> 10 ccatgatctg tgcttgttg aggcgccgc taaagtaccg
 cgcgacc 47 <210> 11 <211> 44<212> DNA<213> Artificial Sequence<220> <223>
 Description-of-Artificial Sequence: artificially synthesized-sequence<400> 11cctgcccac
 catgacctag cggccgcttc-ccattcacc-ctggg 44 <210> 12<211> 44<212> DNA<213>
 ArtificialSequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized
 sequence <400> 12 cccagggtga atgggaagcg gccgctaggt catggatggg cagg 44 <210> 13
 <211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial
 Sequence: artificially synthesized sequence <400> 13 gcggcgcgcc atgctgctgc tgctgctgct
 gctgggcctg 40 <210> 14 <211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 14 gcggcgcgcc
 cttatcatgt ctgctcgaag cggccggccg 40 <210> 15 <211> 74<212> DNA <213> Artificial
 Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 15 gcggccgcgt ttaaagcgcg gccatttaa atccgtagta agaaaaactt agggtgaaag 60
 ttcacgcgg ccgc 74 <210> 16 <211> 74<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 16 gcggccgcga
 tgaacttca ccctaagttt ttcttactac ggatttaa atggcgcgcgt 60 ttaaagcgg ccgc 74 <210> 17
 <211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial
 Sequence: artificially synthesized sequence <400> 17 ggagaagtct caacaccgtc cacccaagat
 aatcgatcag 40 <210> 18<211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223>
 Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 18 ctgatcgatt
 atcttggtg gacggtgtg agactctcc 40 < Artificial Sequence[210> 19 <211> 38<212> DNA
 <213>] <220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence
 <400> 19 gtatatgtgt tcagttgagc ttgctgcgg tctaaggc 38 < Artificial Sequence[210> 20
 <211> 38<212> DNA <213>] <220><223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence <400> 20 gccttagacc gacagcaagc tcaactgaac acatatac 38 <210> 21

<211> 45<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized-sequence<400> 21caatgaactc tctagagagg ctggagtcac-taaagagtta-cctgg 45 <210> 22<211> 45<212> DNA<213> Artificial-Sequence<220> <223> Description-of-Artificial-Sequence: artificially synthesized sequence<400> 22ccaggtaaact ctttagtgac tccagcctct ctagagagtt cattg 45 <210> 23 <211> 52<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 23 gtgaaagttc atccaccgat cggctcactc gaggccacac ccaacccac cg 52 <210> 24 <211> 52<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 24 cgggtgggggtt ggggtgtggcc tcgagtgagc cgatcgggtg atgaactttc ac 52 <210> 25 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 25 cttaggggtga aagaaatttc agctagcacg gcgcaatggc agatatc 47 <210> 26 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 26 gatattctgcc attgogccgt gctagctgaa atttcttca ccctaag 47 <210> 27 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 27 cttagggata aagtcccttg tgcgcgcttg gttgcaaac tctccc 47 <210> 28 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 28 ggggagagtt ttgcaaccaa gcgcgcacaa gggactttat ccctaag 47 <210> 29 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 29 ggtcgcgcgg tactttagtc gacacctcaa acaagcacag atcatgg 47 <210> 30 <211> 47<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 30 ccatgatctg tgcttgttg aggtgtgcac taaagtaccg cgcgacc 47 <210> 31 <211> 49<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 31 cccagggtga atgggaaggg ccggccaggt catggatggg caggagtcc 49 <210> 32 <211> 49<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of-Artificial-Sequence: artificially synthesized-sequence<400> 32ggactcctgc ccatacatga cctggccggc-ccttccatt-caccctggg 49 <210> 33<211> 72<212> DNA<213> Artificial Sequence<220> <223> Description-of-Artificial-Sequence: artificially synthesized sequence <400> 33 ggccgcttaa ttaacggtt aaacgcgcgc caacagtgtt gataagaaaa acttaggggtg 60 aaagttcatc ac 72 <210> 34 <211> 72<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 34 ggccgtgatg aacttcacc ctaagttttt cttatcaaca ctgttggcgc gcgtttaaac 60 cgtaattaa gc 72 <210> 35<211> 50 <212> DNA<213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence: artificiallysynthesized sequence <400> 35 cgtgcagaac gatcgaagct ccgcggccgc tggaagtctt ggacttgtcc 50 <210> 36 <211> 50<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesizedsequence <400> 36 ggacaagtcc aagactcca gcggccgcgg agcttcgatc gttctgcacg 50 <210> 37 <211> 44<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 37 gcggcgcgcc aaccatgaac ttctgtctgt cttgggtgca ttgg 44 <210> 38 <211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 38 gcggcgcgcc tcaccgctc ggcttgcac atctgcaagt 40 <210> 39 <211> 60<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence <400> 39 ggccgctaag aaaaacttag

ggtgaaagtt cacttcacga gggcgcgccg tttaaactgc 60 <210> 40 <211> 60<212> DNA <213>
Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized
sequence <400> 40 ggccgcagtt taaacggcgc gccctcgtga agtgaacttt caccctaagt tttccttagc
60

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the structure (B) of five kinds of Sendai Virus genomes cDNA which newly introduced the NotI site with subcloning (A) of a Sendai Virus genome cDNA fragment, and were built.

[Drawing 2] It is drawing showing the structure of the plasmid for cloning for adding a NotI site, an imprint start signal, interleaved array, and the conclusion signal of an imprint to SEAP.

[Drawing 3] It is drawing showing the structure (B) of DNA for cloning for inserting a foreign gene in the structure (A) of the Sendai Virus genome of the lower stream of a river of L gene, and the lower stream of a river of L gene.

[Drawing 4] It is drawing showing the result of the plaque assay of each Sendai Virus vector. Some fluorescence images of plaque assay captured by LAS1000 are shown.

[Drawing 5] It is drawing showing the result of having compared the difference in the amount of manifestations of the reporter gene (SEAP) between each Sendai Virus vector. The relative value was expressed, respectively, having used the data of SeV18+/SEAP as 100. It turned out that the activity of manifestations, i.e., the amount, falls as the SEAP gene was located down-stream.

[Drawing 6] It is drawing showing the structure of the multi-cloning site built to the Sendai Virus genome cDNA.

[Drawing 7] It is drawing showing the structure of a multi-cloning site. A base sequence shows the example of the restriction enzyme site of PaeI-PmeI-BssHII-TspRI, and the multi-cloning site which has an E/I/S array.

[Drawing 8] It is drawing showing the structure of the Sendai Virus genome cDNA which newly introduced the Not I site with subcloning of a Sendai Virus genome cDNA fragment, and was built.

[Drawing 9] It is drawing showing the structure of the plasmid for cloning for adding a Not I site, an imprint start signal, interleaved array, and the conclusion signal of an imprint to VEGF, and the structure of VEGF after addition.

[Drawing 10] It is drawing showing the comparison of the amount of manifestations of the SeV vector of VEGF loading by ELISA. What carried VEGF after L gene had the lowest amount of manifestations.

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.